

Aus dem Institut für Anatomie  
(Leiter: Prof. Dr. Hans-Joachim Merker)  
des Fachbereichs Natur- und sozialwissenschaftliche  
Grundlagenmedizin und medizinische Ökologie  
der Freien Universität Berlin

**Untersuchung des Wachstumsverhaltens und der  
morphologischen Veränderungen  
embryonaler menschlicher Fibroblasten  
nach in-vitro-Behandlung  
mit  
cis-Diammindichloroplatin (II),  
Titanocen-dichlorid und Vanadocen-dichlorid**

Dissertation  
zur  
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde  
am Fachbereich Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Zahnarzt Gordian Hermann  
aus Polling

1984







Aus dem Institut für Anatomie  
(Leiter: Prof. Dr. Hans-Joachim Merker)  
des Fachbereichs Natur- und sozialwissenschaftliche  
Grundlagenmedizin und medizinische Ökologie  
der Freien Universität Berlin

Untersuchung des Wachstumsverhaltens und der  
morphologischen Veränderungen  
embryonaler menschlicher Fibroblasten  
nach in-vitro-Behandlung  
mit  
cis-Diammindichloroplatin(II),  
Titanocen-dichlorid und Vanadocen-dichlorid

Dissertation  
zur  
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde  
am Fachbereich Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Zahnarzt Gordian Hermann  
aus Polling

Referent: Privat-Doz. Dr. Petra Köpf-Maier

Korreferent: Prof. Dr. Hans Lenz

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches Zahn-, Mund- und  
Kieferheilkunde der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 30.06.1984

Meinen lieben Eltern

# INHALTSVERZEICHNIS

| Kapitel                                                                 | Seite |
|-------------------------------------------------------------------------|-------|
| Erklärung der gebräuchlichsten Abkürzungen                              | 7     |
| 1. Aufgabenstellung                                                     | 8     |
| 2. Bisheriger Kenntnisstand                                             | 9-17  |
| 2.1. cis-Diammündichloroplatin(II) (DDP)                                | 9-13  |
| 2.2. Zytostatisch wirksame Metalloocene                                 | 13-17 |
| 3. Material und Methoden                                                | 18-26 |
| 3.1. Zellmaterial                                                       | 18    |
| 3.2. Zellkulturtechnik                                                  | 18-19 |
| 3.3. Substanzen und Substanzapplikation                                 | 20-22 |
| 3.4. Bestimmung des Zellwachstums und des Avitalitätsindex              | 22-23 |
| 3.5. Lichtmikroskopische Untersuchung                                   | 23-24 |
| 3.6. Elektronenmikroskopische Untersuchung                              | 25-26 |
| 4. Befunde                                                              | 27-76 |
| 4.1. Wachstumsverhalten                                                 | 27-33 |
| 4.1.1. Wachstumsverhalten der unbehandelten Fibroblasten                | 27    |
| 4.1.2. Wachstumsverhalten der Fibroblasten nach der Applikation von DDP | 27-28 |
| 4.1.3. Wachstumsverhalten der Fibroblasten nach der Applikation von TDC | 28    |
| 4.1.4. Wachstumsverhalten der Fibroblasten nach der Applikation von VDC | 29    |
| 4.2. Bestimmung des Avitalitätsindex                                    | 33-38 |
| 4.2.1. Avitalitätsindex unbehandelter Fibroblasten                      | 33    |
| 4.2.2. Avitalitätsindex embryonaler Fibroblasten nach DDP-Behandlung    | 33-34 |
| 4.2.3. Avitalitätsindex embryonaler Fibroblasten nach TDC-Behandlung    | 34    |

|          |                                                                                                     |       |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 4.2.4.   | Avitalitätsindex embryonaler Fibroblasten<br>nach VDC-Behandlung                                    | 34-35 |
| 4.3.     | Lichtmikroskopische Befunde                                                                         | 39-48 |
| 4.3.1.   | Beschreibung der unbehandelten Zelle                                                                | 39-40 |
| 4.3.2.   | Beschreibung der mit VDC behandelten Zelle                                                          | 40-43 |
| 4.3.3.   | Beschreibung der mit DDP und TDC behandelten<br>Zellen                                              | 44    |
| 4.4.     | Elektronenmikroskopische Befunde                                                                    | 49-76 |
| 4.4.1.   | Beschreibung der unbehandelten Zelle                                                                | 49-55 |
| 4.4.2.   | Beschreibung der mit VDC behandelten Zellen                                                         | 56-59 |
| 4.4.2.1. | Befunde bei einer Konzentration von $10^{-6}$ M                                                     | 56-58 |
| 4.4.2.2. | Befunde bei einer Konzentration von $10^{-5}$ M                                                     | 58-59 |
| 4.4.3.   | Beschreibung der mit TDC behandelten Zellen                                                         | 59-61 |
| 4.4.4.   | Beschreibung der mit DDP behandeltem Zellen                                                         | 61-63 |
| 5.       | Diskussion                                                                                          | 77-87 |
| 5.1      | Diskussion des Wachstumsverhaltens und des<br>Avitalitätsindex                                      | 77-79 |
| 5.2.     | Diskussion der morphologischen Veränderungen<br>im licht- und elektronenmikroskopischen<br>Bereichs | 79-87 |
| 5.2.1.   | Überlegungen zum Mitoseverhalten                                                                    | 79-87 |
| 5.2.2.   | Zytoplasmatische Veränderungen                                                                      | 80-83 |
| 5.2.2.1. | Veränderungen an den Mitochondrien                                                                  | 80-81 |
| 5.2.2.2. | Veränderungen am GOLGI-System                                                                       | 81    |
| 5.2.2.3. | Veränderungen am rauen endoplasmatischen<br>Retikulum (rER)                                         | 82-83 |
| 5.2.3.   | Veränderungen am Kern                                                                               | 84-87 |
| 6.       | Zusammenfassung                                                                                     | 88-90 |
| 7.       | Literaturverzeichnis                                                                                | 91-96 |



## Erklärung der verwendeten Abkürzungen

|      |                                                    |
|------|----------------------------------------------------|
| DDP  | cis-Diammindichloroplatin(II), Strukturformel S.18 |
| DNA  | Desoxyribonukleinsäure                             |
| DMSO | Dimethylsulfoxid                                   |
| EAT  | Ehrlich-Aszites-Tumor                              |
| FKS  | Fötales Kälberserum                                |
| HDC  | Hafnocen-dichlorid                                 |
| M    | Molar, molar                                       |
| MDC  | Molybdenocen-dichlorid                             |
| MEM  | "Minimum Essential Medium"                         |
| rER  | Rauhes endoplasmatisches Retikulum                 |
| TDC  | Titanocen-dichlorid, Strukturformel S.18           |
| VDC  | Vanadocen-dichlorid, Strukturformel S.18           |
| ZDC  | Zirkonocen-dichlorid                               |

1.        Aufgabenstellung

Thema dieser Arbeit ist es, das Verhalten embryonaler, menschlicher Fibroblasten als Beispiel normal strukturierter Zellen unter Einwirkung der neuartigen metallorganischen Antitumor-Wirkstoffe Vanadocen-dichlorid und Titanocen-dichlorid zu untersuchen. Als Referenzsubstanz dient dabei das in der Klinik bereits bewährte und strukturell in manchen Punkten ähnliche cis-Diammindichloroplatin(II). Folgende Gesichtspunkte sollen hierbei besonders herausgearbeitet werden:

1. Durch Erstellen von Wachstumskurven soll zunächst ermittelt werden, ob überhaupt ein zytostatischer Effekt an embryonalen Fibroblasten nachzuweisen ist und welche Dosis-Wirkungs-Beziehungen existieren.
2. Durch quantitative Bestimmung des Avitalitätsindex soll die direkt-zytotoxische Wirkung auf embryonale Fibroblasten ermittelt werden.
3. Die lichtmikroskopische Untersuchung soll Aufschlüsse über morphologische Veränderungen der Zellen unter Berücksichtigung verschiedener Dosierungen der Wirksubstanzen erbringen.
4. Zur weiteren Analyse der zellulären Veränderungen unter Einwirkung der Testsubstanzen erfolgt eine elektronenmikroskopische Untersuchung der behandelten Fibroblasten.

## 2. Bisheriger Kenntnisstand

### 2.1. cis-Diammindichloroplatin(II), DDP

Seit der Entdeckung der zytostatischen Eigenschaften des DDP im Jahr 1965 an *Escherichia coli* und den grundlegenden Arbeiten in den folgenden Jahren durch ROSENBERG et al.<sup>32,33,34</sup> wurde die Wirksamkeit dieses ersten anorganischen Zytostatikums an zahlreichen experimentellen und natürlichen Tumoren unter Beweis gestellt. Einen guten Überblick über den aktuellen Stand der klinischen Bedeutung von DDP geben die Arbeiten von GOTTLIEB<sup>8</sup> und WITSHAW<sup>45</sup>. Obwohl es zahlreiche Untersuchungen über die pharmakologischen Eigenschaften von DDP und viele experimentelle Arbeiten gibt, die sich mit der Klärung des Wirkungsmechanismus beschäftigen, weiß man verhältnismäßig wenig über die Wirkung von DDP auf zellulärer Ebene, insbesondere über die Beeinflussung der Zellkinetik und des morphologischen Erscheinungsbildes nach DDP-Behandlung. In diesem Zusammenhang sind vornehmlich die Arbeiten von AGGARWAL<sup>1,2,3,4,38</sup>, SODHI<sup>1,38,39,40,41</sup> und HEINEN & BASSLEER<sup>10,11</sup> erwähnenswert.

AGGARWAL und SODHI beschäftigten sich zunächst in den oben angesprochenen Arbeiten mit der grundlegenden Beeinflussung der Zellkinetik von Säugerzellen in vivo und in vitro, untersuchten aber auch licht- und elektronenmikroskopisch Einzelzellen nach DDP-Behandlung. Besonders eindrucksvoll sind dabei die Ergebnisse der Untersuchung an Sarcoma-180-Zellen, in der die Autoren lichtmikroskopisch eine DDP-induzierte Blockierung der Mitosetätigkeit feststellten. Diese war um so stärker, je länger die Behandlung mit DDP durchgeführt wurde: So war die Zahl der Mitosen nach nur einstündiger Behandlung mit DDP (60 bis 200 µg/ml im Kulturmedium) um die Hälfte geringer als bei der unbehandelten Kontrollpopulation, wohingegen nach 24 h gar keine Mitosefiguren mehr nachzuweisen waren. Gaben die Autoren beim in-vitro-Versuch die behandelten Zellen in ein normales Nährmedium zurück, so erholten sie sich und nahmen spätestens

24 h nach Rückführen in das normale Nährmedium ihre normale Mitosetätigkeit wieder auf.

Unmittelbar nach der Behandlung war auch eine Vergrößerung des Zytoplasmavolumens nachzuweisen, der später eine Kernvergrößerung folgte. Während dieses "Anschwellens" beobachteten AGGARWAL<sup>4</sup> und SODHI<sup>40</sup> ein kreisförmiges Zusammenrücken der Zellorganellen um den Kern. Dies ließ sich insbesondere elektronenmikroskopisch nachweisen, stellte sich aber auch lichtmikroskopisch dar. Ein bis zwei Tage nach DDP-Behandlung zeigte sich darüberhinaus eine Zunahme der Fetteinlagerung im Zytoplasma und eine zunehmend stärkere Vakuolenbildung. Diesen zytotoxischen Veränderungen maßen HEINEN & BASSLEER<sup>10,11</sup> große Bedeutung zu und interpretierten sie als direktes Abbild des zytotoxischen Effekts von DDP.

Als eindrucksvolle lichtmikroskopische Veränderung beschrieben AGGARWAL und SODHI<sup>40,41</sup> das Auftreten von Riesenzellen. Sie unterschieden dabei zwei von der Ätiologie her unterschiedliche Typen:

Der erste Typ trat etwa vier Tage nach Behandlung auf. Es handelte sich bei diesen Riesenzellen um große, mehrkernige Zellen, deren Kerne durch dünne Karyoplasmabrücken untereinander verbunden waren und die aufgrund dessen alle eine gemeinsame Kernmembran zu besitzen schienen. In der Nähe der Kerne traten Einstülpungen der Zellmembran auf, die als Ausdruck einer inkompletten Zellteilung bei fortgesetzter Kernteilung interpretiert wurden. Es handelte sich also um eine Abkopplung der "normal" verlaufenden Kernteilung, die zunächst von der Zytoplasmadurchschnürung unbeeinflusst blieb, die unter DDP-Behandlung offensichtlich nicht mehr erfolgte. In unmittelbarem Zusammenhang mit der Entstehung dieser Riesenzellen sahen AGGARWAL und SODHI<sup>40,41</sup> auffällige Veränderungen in der Struktur und Anordnung der Mikrofilamente. Eine halbe Stunde nach Behandlung kam es zu einer ringförmigen Anordnung der Mikrofilamente um den Kern, während diese bei der unbehandelten Zelle gleichmäßig im Zytoplasma verteilt waren. Etwa eine

Stunde später verschwanden die Mikrofilamente völlig. Ein Zusammenhang mit der inkompletten Zellteilung in Folge dieses Defekts wurde von den Autoren vermutet.

Im Gegensatz hierzu stand der zweite Riesenzellentyp. Diese Zellen sollten als Ergebnis einer direkten Einwirkung des DDP auf die Zellmembran entstanden sein, deren genauer Mechanismus nicht bekannt ist. Diese Zellen traten erst etwa zehn Tage nach DDP-Behandlung auf. Es kam nach Meinung der Autoren zur Auflösung von Zellmembranabschnitten und dem Zusammenfließen benachbarter Zellen. Die aufgelösten Membranabschnitte erschienen dann offensichtlich als kleine Vesikel in den nun gebildeten Riesenzellen.

In vitro zeigten sich in den Untersuchungen von SODHI<sup>39</sup> auch elektronenmikroskopisch Veränderungen an den Mitochondrien, während in vivo die Mitochondrien unverändert blieben. Neben der oben schon beschriebenen ringförmigen Anordnung um den Kern verloren sie ihr elektronendichtes Aussehen und wurden transparenter. Sie schienen dabei regelrecht anzuschwellen. Die cristae mitochondrales wurden unregelmäßig und die Grundstruktur des Zytoplasmas wurde von SODHI<sup>38,39,41</sup> und AGGARWAL<sup>1,2,4</sup> nach erfolgter Behandlung als wesentlich elektronentransparenter beschrieben. Das rauhe Endoplasmatische Retikulum (rER) bildete sich zurück, während sich die freien Ribosomen zu Klumpen zusammenballten. Bei zahlreichen Zellen wurde eine Auflösung des Golgi-Apparates in zahlreiche kleine Vesikel beschrieben. Auch der Kern zeigte degenerative Veränderungen, es bildeten sich Chromatinklumpungen aus. Im Gegensatz hierzu wiesen aber die oben beschriebenen Riesenzellen keine Chromatinklumpungen auf, auch war bei ihnen der Golgi-Apparat normal ausgeprägt.

Besondere Bedeutung maß SODHI<sup>39</sup> dem Freisetzen von Viruspartikeln nach DDP-Behandlung von Sarcoma-180-Tumorzellen zu. Es handelt sich um 420 Å große Viruspartikel, die umfaßt von einer Einzelmembran, stets außerhalb behandelter Zellen zu

beobachten waren. Diese Virusfreisetzung wurde von SODHI<sup>39</sup> für die veränderte antigene Struktur der Tumorzelle nach DDP-Behandlung verantwortlich gemacht. Daß offensichtlich eine immunologische Veränderung stattfand, wurde auch durch das Einwandern von immunkompetenten Zellen in den Tumor einige Tage nach in-vivo-Behandlung verdeutlicht.

Neben dieser Virusinduktion wurden von SODHI & SARNA<sup>41</sup> aber auch direkte Einwirkungen auf die Zellmembran für eine Veränderung der antigenen Struktur der Zelloberfläche verantwortlich gemacht. Dabei sollte es zu einer Loslösung von Mukopolysacchariden von der Zellmembran und damit zu Veränderungen der molekularen Struktur der Zelloberfläche kommen. Diese Annahme von SODHI & SARNA<sup>41</sup> wurde auch durch die Arbeit von LUFT<sup>29</sup> bestätigt, der die Ablösung der Mukopolysaccharide nach DDP-Behandlung mit einer zytochemischen Methode bewies.

Zusammenfassend kann über die bisherigen Kenntnisse und Theorien bezüglich des Wirkungsmechanismus von DDP folgendes gesagt werden:

1. HEINEN & BASSLEER<sup>10,11</sup> vermuten eine Verhinderung der DNA-Replikation, wahrscheinlich aufgrund einer Blockierung behandelter Zellen in der  $G_2$ -Phase. Bei anderen Zellen soll sich unabhängig von dieser  $G_2$ -Blockierung das chromosomale Material wiederholt über einen Mechanismus vermehren, der sich grundsätzlich von der Mitose unterscheidet, und als Endomitose bezeichnet wird. Dieser Meinung schließt sich auch SODHI<sup>40</sup> an. Als unmittelbarer Angriffspunkt wird also von diesen Autoren die DNA angesehen.
2. Als Folge des  $G_2$ -Blocks kommt es nach HEINEN & BASSLEER<sup>10,11</sup> zu starken degenerativen Zellveränderungen, so daß der zytostatische Effekt von DDP in einer direkten Zellschädigung mit allen Komponenten der Zellnekrose zum Ausdruck kommt.

3. Von AGARWAL und SODHI<sup>1,2,3,38,39,40</sup> wird eine Hemmung der Zytoplasmateilung (Zytokinese) trotz wiederholter Kernteilung (Karyokinese) postuliert. Neben dem Einfluß von DDP auf die DNA wird in diesem Zusammenhang als maßgebliche Ursache die Zerstörung der Mikrofilamente angenommen.
4. Untersuchungen von SODHI<sup>41</sup> und LUFT<sup>29</sup> deuten auf Veränderungen der Zelloberfläche hin, die die antigene Struktur der Einzelzelle verändern. Einerseits könnte dies durch Freisetzung von Viruspartikeln unter DDP-Behandlung erfolgen, andererseits ist auch eine direkte Einwirkung des Zytostatikums auf die Zelloberfläche nachweisbar. Wahrscheinlich geschieht diese durch eine Ablösung von Mukopolysacchariden von der Zellmembran und damit durch eine Veränderung der antigenen Oberflächenstruktur.

## 2.2. Zytostatisch wirksame Metalloocene

Im Jahr 1979 wurde von KÖPF-MAIER et al.<sup>13,14</sup> die zytostatische Wirksamkeit der Metalloocene Titanocen-dichlorid (TDC) und Vanadocen-dichlorid (VDC) unter Beweis gestellt. Im Tierversuch wurde an Ehrlich-Aszites-Tumor-tragenden CF1-Mäusen nachgewiesen, daß beide Substanzen ähnliche zytostatische Eigenschaften wie DDP besaßen. Andere Metalloocene wie Hafnocen-dichlorid (HDC) und Zirkonocen-dichlorid (ZDC) dagegen zeigten keine Antitumor-Aktivität, wie KÖPF-MAIER et al.<sup>16</sup> in einer weiteren Arbeit bewiesen. Dieser Unterschied der an sich von der chemischen Struktur her sehr ähnlichen Substanzen führte zu ersten Vermutungen über den Wirkungsmechanismus (KÖPF-MAIER et al.<sup>19</sup>). Ähnlich wie beim DDP wurde auch hier eine direkte Wirkung auf die DNA vermutet, wobei es sich wahrscheinlich um Verbrückungen innerhalb gleicher DNA-Stränge handeln dürfte ("intrastrand-cross-links"). Untersuchungen mit verschiedenen chemisch modifizierten Metalloocenen bestätigten diese Hypothese des Wirkungsprinzips (KÖPF-MAIER et al.<sup>18,19,20</sup>).

Neben den bisher am EAT-System erfolgten Untersuchungen führte KÖPF-MAIER<sup>21</sup> auch Testungen an Leukämie-Tumoren durch (lymphoid leukemia L 1210 und lymphocytic leukemia P 388) und konnte auch hier die Wirksamkeit der Metalloocene TDC und VDC als Antitumor-Wirkstoffe beweisen. Die Ergebnisse deckten sich mit den am EAT-System erhobenen Befunden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch die Wirksamkeit von DDP, TDC, VDC an fortgeschrittenen Ehrlich-Aszites-Tumor (Behandlung nicht nur 24 h nach Tumortransplantation) untersucht. Die Überlebensraten nahmen dabei bis zum siebten Tag stark ab, wobei sich aber eine eindeutige Überlegenheit des TDC gegenüber dem VDC herausstellte.

Im Jahre 1981 untersuchten KÖPF-MAIER et al.<sup>22</sup> die zytostatische Aktivität von TDC, VDC, MDC, ZDC und HDC an einer Suspensionskultur von aus der Maus gewonnenen EAT-Zellen. Sie beschrieben die Dosis-Wirkungsbeziehungen der einzelnen Metalloocene durch Erstellen von Wachstumsreihen. Überraschenderweise zeigte es sich, daß VDC das Zellwachstum schon bei einer Konzentration von  $5 \times 10^{-6}$  M hemmte, während TDC und MDC - um die gleiche Wirkung wie VDC zu erreichen - in Konzentrationen von  $5 \times 10^{-4}$  M also in einer hundertfach höheren Konzentration angewandt werden mußten. Dies stand scheinbar im Widerspruch zu den Befunden bei weit fortgeschrittenen EAT (KÖPF-MAIER et al.<sup>21</sup>), wo ja das TDC dem VDC deutlich überlegen war. KÖPF-MAIER<sup>22</sup> deutete diesen Unterschied als Ausdruck einer unterschiedlichen Stimulierung immunologischer Prozesse oder einer Induktion metabolischer Vorgänge, die beim TDC möglicherweise anders verlief als beim VDC. HDC und ZDC zeigten in Übereinstimmung mit den in-vivo-Befunden erst bei sehr hohen Substratkonzentrationen eine Beeinflussung des Zellwachstums, so daß davon auszugehen war, daß es sich bei diesen Substanzen um unspezifisch-zytotoxische Effekte handelte.

Der Avitalitätsindex wurde durch eine Vitalfärbung mit Lissamingrün nach HOLMBERG<sup>12</sup> ermittelt. Die Gabe von hochkonzentriertem VDC ( $10^{-4}$  M) und TDC ( $5 \times 10^{-3}$  M) zeigte, daß nach

72 h 80 bis 95% aller Zellen avital oder irreversibel geschädigt waren. Bei mittleren Konzentrationen ließen sich aber immer noch 35 bis 55% avitale Zellen nachweisen.

Neben den aufgeführten quantitativen Untersuchungen beschrieben KÖPF-MAIER et al.<sup>24,25,26</sup> auch das ultrastrukturelle Bild der Tumورهemmung. Hierzu wurden unbehandelte und mit VDC, TDC und DDP behandelte EAT-Zellen aus der Maus entnommen und für die Licht- und Elektronenmikroskopie aufbereitet. Lichtmikroskopisch standen hier zunächst Mitoseanomalien im Vordergrund. Bereits 3 h nach Behandlung waren pyknotische Metaphasen, zurückbleibende Chromosomen während der Anaphase und ungleiche Verteilung der Chromosomen auf beide Zellpole zu erkennen. Besonders nach VDC-Behandlung fanden sich dann auch viele drei- und vierpolige Mitosen, wobei zusätzlich die Aufteilung der Chromosomen auf die jeweiligen Zellpole ungleichmäßig war. Daneben zeigten sich auch amitotische Kernteilungen. 12 bis 24 h nach Behandlung war auch eine Vermehrung der Nukleoli zu beobachten, während die unbehandelten EAT-Zellen stets nur einen Nukleolus aufwiesen. Später beschrieb die Autorin degenerative Kern- und Zytoplasmaveränderungen, die Zellen wurden nekrotisch. Gleichzeitig traten Makrophagen, Leukozyten und Lymphozyten auf, die 96 h nach Behandlung ca. 80% aller Asziteszellen ausmachten.

Auch die beim DDP beschriebenen Riesenzellen traten bei der Behandlung mit den Metalloenen auf. KÖPF-MAIER<sup>26</sup> beschrieb einkernige Riesenzellen mit einem deutlich vergrößerten Kern, aber auch mehrkernige Riesenzellen mit drei bis vier, aber auch bis zu acht Kernen unterschiedlicher Größe. Im Zytoplasma fanden sich häufig Vakuolen. Drei Tage nach Behandlung lagen etwa 28% aller Tumorzellen als ein- oder mehrkernige Riesenzellen vor, später nahm ihre Zahl wieder ab.

Elektronenmikroskopisch standen auffällige Kernveränderungen im Vordergrund. Die Kernoberfläche vergrößerte sich, es kam zu Einstülpungen der Kernmembran bereits 4 h nach erfolgter Be-

handlung. Zwölf Stunden später traten deutliche Segmentierungen des Kerns, sowie Chromatinklumpungen und Doppelmembranstrukturen im Kern auf. Im Zytoplasma standen die Vermehrung der Zisternen des rER, Zunahme der Anzahl der Mitochondrien, sowie der Fetteinlagerung im Vordergrund. Veränderungen der Mikrotubuli und Mikrofilamente konnte KÖPF-MAIER<sup>26</sup> nach der in vivo-Behandlung nicht beobachten. Auch die freien Ribosomen veränderten sich nicht. Bei der Behandlung mit TDC waren 8 bis 10 h nach Behandlung im Nukleolus, und zwar immer in der Nähe der Kernmembran, wurmförmige Verdichtungsfiguren und kurze Zeit später das Auftreten sphärischer Partikel (Durchmesser 50 bis 80 nm) im Zytoplasma nachzuweisen. Diese Strukturen fand KÖPF-MAIER<sup>26</sup> auch nach DDP-Behandlung. Interpretiert wurden sie als intrazytoplasmatische Viren des Typs A. Also schien beim TDC eine Virusfreisetzung ebenfalls stattzufinden, die möglicherweise zu einer Veränderung der antigenen Struktur der Zelloberfläche nach TDC-Behandlung führt und die Zerstörung und Phagozytose der behandelten Tumorzellen durch Makrophagen aufgrund immunologischer Vorgänge einleiten könnte. Dieser Unterschied würde auch die abgeschwächte Wirkung von VDC in vivo bei weit fortgeschrittenen Stadien des EAT erklären.

In späteren Beobachtungszeiträumen standen degenerative Zellveränderungen der mit TDC und VDC behandelten Zellen im Vordergrund. Die Mikrovilli, ein typisches Merkmal der unbehandelten Tumorzelle, verschwanden und die Zahl desintegrierter Zytoplasmabezirke nahm zu. Am zweiten Tag nach Behandlung begann die Phagozytose der veränderten Tumorzellen durch eingewanderte Makrophagen. Die analoge Untersuchung der mit DDP behandelten Zellen ergab große Ähnlichkeit mit den Veränderungen, die bei TDC-Behandlung auftraten, die Befunde zeigten sich nach DDP-Behandlung jedoch verzögert. Die beim TDC beschriebenen wurmförmigen Verdichtungsformen im Kern, die als Virusvorstufe gedeutet wurden, konnten nach DDP-Behandlung allerdings nicht beobachtet werden (KÖPF-MAIER<sup>26</sup>).

Die morphologischen Erkenntnisse wertete KÖPF-MAIER<sup>22,25,26</sup> als Bestätigung ihrer bisherigen Befunde. VDC und TDC haben ihren primären Angriffspunkt wahrscheinlich an der DNA des Kerns. Es kommt dadurch zu einem prämitotischen G<sub>2</sub>-Block, der sein Substrat in morphologischen Veränderungen der Zelloberfläche, der Kernoberfläche und dem Auftreten von Doppelmembranstrukturen hat. Im Gegensatz zum TDC kommt es nach einmaliger VDC-Behandlung zu einer Erholung der mitotischen Aktivität etwa 12 bis 24 h nach Behandlung. Die Veränderung der Zellorganellen wurde als Ausdruck der Intensivierung der Proteinsynthese angesehen, während die DNA-Synthese blockiert war ("unbalanced cell growth"). Daneben spielte bei der Untersuchung von TDC die Freisetzung von Viruspartikeln und eine damit verbundene Veränderung der antigenen Struktur der Zellen eine bedeutende Rolle. Trotz gewisser Ähnlichkeit der Befunde nach TDC- und VDC-Behandlung mit den Ergebnissen nach DDP-Applikation, gab es doch etliche Unterschiede, die weiterer Forschung bedürfen.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Zellmaterial

Als Zellmaterial dienten menschliche Fibroblasten, die als Monolayerkultur wuchsen und von der Firma SEROMED, München bezogen wurden. Die Fibroblasten wurden - laut Firmenangabe - aus embryonalem Lungengewebe nach steriler Organpräparation durch enzymatisches, fraktioniertes Aufschließen bei 37° C gewonnen.

Anschließend erfolgte die Prüfung auf Mykoplasmenkontamination mittels einer auf DNA-Floureszenz basierenden Methode (BARILE<sup>5</sup>). Die Sterilität der Kulturen wurde durch Verimpfen von Zellmaterial auf Standardnährböden sichergestellt.

Die Lieferung der Zellen erfolgte in der 1. bis 5. Kulturpassage. Zu diesem Zeitpunkt handelte es sich noch um eine embryonale Mischkultur mit wenigen epithelialen Zellen neben reichlich Fibroblasten. Durch zweifaches Subkultivieren (vgl. Kapitel 3.2.) wurde schließlich eine reine Fibroblastenkultur gewonnen.

#### 3.2. Zellkulturtechnik

Als Nährlösung für die Kulturen diente "Minimum Essential Medium" (MEM) mit Earle's Salzen und 0,85 g/l NaHCO<sub>3</sub> ohne Glutamin. Für die Kultivierung wurden jeweils 500 ml MEM mit 62,5 ml fötalem Kälberserum (FKS), 6,5 ml L-Glutamin und 6,5 ml einer Antibiotikallösung, die 10 mg Streptomycin und 1000 I.E. Penizillin pro ml enthielt, supplementiert. Das Medium, die ergänzenden Substanzen, sowie die später erwähnte Trypsinlösung stammten von der Firma SEROMED, München.

Nach Lieferung der Kulturen wurde zunächst das Transportmedium zu 2/3 abgegossen. Während der nachfolgenden 24 h wurden die Kulturen bei 37° C im trockenen Brutschrank mit dem verblei-

benden Medium inkubiert, um anschließend subkultiviert zu werden.

Zu diesem Zweck wurde das Transportmedium abgegossen und der Zellrasen mit Trypsinlösung (0,25% Trypsin in PBS ohne  $\text{Ca}^{++}$  und  $\text{Mg}^{++}$ ) im Überschuß gespült. Nach Abgießen des Trypsins wurden erneut 6 ml der Trypsinlösung in die Kulturflasche gegeben und bei  $37^{\circ}\text{C}$  für 5 min. inkubiert. Nach Ablösen der Zellen wurden 15 bis 20 ml vorgewärmtes, supplementiertes Medium hinzugefügt, um das Trypsin zu inaktivieren und die abgelösten Zellen zu suspendieren.

Anschließend wurde die Zellsuspension für 5 min bei 900 U.p.m. zentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Zellsediment im Nährmedium resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl in der Zählkammer erfolgte die Einsaat von jeweils  $1,5 \times 10^6$  Zellen in vorbereitete, mit 15 ml supplementiertem Medium angefüllten Kulturflaschen, um anschließend bei  $37^{\circ}$  im trockenen Brutschrank inkubiert zu werden.

Die Zellen wurden als Permanentkultur bis zur 15. Passage unter konstanten Bedingungen gehalten. Die Dauer der einzelnen Passage betrug jeweils 7 Tage, wobei das Nährmedium jeden zweiten Tag gewechselt und nach Ablauf des 7. Tages erneut eine Subkultivierung entsprechend dem oben beschriebenen Vorgang durchgeführt wurde.

Die für die laufenden Versuche benötigten Zellen wurden bei der Subkultivierung aus der Permanentkultur entnommen, ohne die Kultivierungsbedingungen dieser zu verändern. Dadurch variierte bei den chronologisch aneinander gereihten Versuchen lediglich das Passagealter der Zellen.

### 3.3. Substanzen und Substanzapplikation

Bei den zu untersuchenden zytostatisch wirksamen Substanzen handelte es sich

1. um zwei Repräsentanten der metallorganischen Verbindungs-  
klasse der Metallocen-dihalogenide, um Titanocen-dichlorid  
(TDC) und um Vanadocen-dichlorid (VDC), deren Antitumor-Akti-  
vität erst vor wenigen Jahren aufgedeckt wurde (s.Kap.2.2.)

2. um das anorganische cis-Diammindichloroplatin(II) (DDP),  
dessen zytostatische Wirksamkeit bereits seit Ende der sechzi-  
ger Jahre bekannt ist (s. Kap. 2.1.) und das bereits als  
PLATINEX bzw. PLATINOL in die Klinik Eingang gefunden hat.

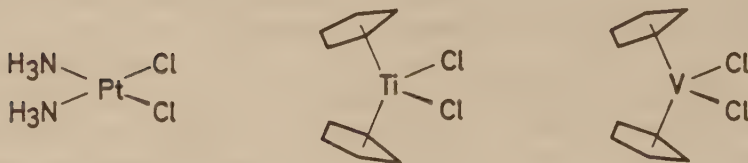


Abb. 1: Strukturformeln der getesteten Substanzen.

Links das cis-Diammindichloroplatin(II), (DDP),  
in der Mitte Titanocen-dichlorid (TDC),  
rechts Vanadocen-dichlorid (VDC).

Alle drei Substanzen wurden im Institut für Anorganische und  
Analytische Chemie der Technischen Universität Berlin von H.  
KÖPF und Mitarbeitern nach Literaturangaben dargestellt  
(PEYRONE<sup>31</sup>, WILKINSON & BIRMINGHAM<sup>44</sup>).

Die C-, H- und Cl-Elementaranalysen ergaben korrekte Werte,

deren Abweichungen von den berechneten Werten weniger als  $\pm 0.5\%$  betrugen. Mit spektroskopischen Methoden ließen sich keine Verunreinigungen nachweisen.

Zum Zwecke der Substanztestung wurden die den jeweiligen Endkonzentrationen entsprechende Substanzmengen (Vergl. Kap. 3.4.) in Dimethylsulfoxid (DMSO; SERVA, Heidelberg) unter dreiminütiger Ultraschallbehandlung gelöst bzw. suspendiert, mit supplementiertem Medium aufgenommen und in die Kulturfラスchen auf den Zellrasen gegeben. Die DMSO-Endkonzentration betrug immer  $0.5\%$ . Die unbehandelten Zellen der Kontrollkulturen wurden ebenfalls mit DMSO versetzt, so daß auch hier die Konzentration  $0.5\%$  DMSO betrug.

In Abweichung von diesem Vorgehen wurde bei den Versuchsansätzen mit sehr niedrigen, nicht mehr abwägbaren Substanzkonzentrationen verfahren. Hier wurde die sogenannte Verdünnungsmethode angewandt. Am Beispiel des DDP sieht dies folgendermaßen aus:

100ml einer  $5 \times 10^{-6}$  molaren Lösung enthalten 1.5 mg DDP. Diese Menge ist abwägbar und wird - wie oben beschrieben - in 0.5 ml DMSO gelöst und mit vorgewärmten, supplementiertem MEM auf 100 ml aufgefüllt.

Die  $5 \times 10^{-6}$  molare Lösung erhält man durch Verdünnen der  $5 \times 10^{-5}$  molaren Lösung mit supplementiertem Medium im Verhältnis 1 : 10.

Die  $5 \times 10^{-7}$  molare Lösung wiederum gewinnt man durch Verdünnen der  $5 \times 10^{-6}$  molaren Lösung ebenfalls im Verhältnis 1 : 10.

Schließlich wurden die verdünnten Lösungen jeweils mit soviel DMSO versetzt, daß alle Enllösungen  $0.5\%$  DMSO enthielten.

Im Falle des VDC fand ebenfalls die Verdünnungsmethode Anwendung, wohingegen TDC in allen untersuchten Konzentrationen abwägbar war.

Unmittelbar nach der beschriebenen Auflösung der Substanzen im Kulturmedium wurde der Zellrasen 90 min lang mit diesen Lösun-

gen inkubiert. Danach wurde das substanzhaltige MEM abgegossen und der Zellrasen zweimal mit MEM ohne Substanzzusatz gewaschen, um die Stoffe möglichst vollständig zu entfernen. Im Anschluß daran wurde der Zellrasen wieder mit 15 ml supplementiertem Medium ohne Zytostatika- und DMSO-Zusatz bedeckt und bei 37° C im trockenen Brutschrank inkubiert.

Zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten (vgl. Kap. 3.4., 3.5., 3.6.) wurden die Flaschen aus dem Brutschrank genommen und, wie in den nachfolgenden Kapiteln beschrieben, behandelt.

#### 3.4. Bestimmung des Zellwachstums und des Avitalitätsindex

Der Versuchsansatz zur Bestimmung des Zellwachstums und des Avitalitätsindex ist in Tabelle I zusammengefaßt. In allen Fällen wurde eine genormte Zelleinsaat von  $1.5 \times 10^6$  Zellen pro Flasche vorgenommen. Es folgte eine 48-stündige Vorinkubation in normalem supplementiertem MEM, um ein festes Anhaften der Zellen auf den Böden der Kulturflaschen sicherzustellen. Pro Substanz und Dosisschritt wurden für jeden Zeitpunkt jeweils vier unbehandelte Kontrollen untersucht, die mit derselben Zelleinsaat versehen wurden und im Nährmedium lediglich 0.5% DMSO, jedoch keinen Zytostatikazusatz enthielten.

Zu den Untersuchungszeitpunkten wurden die jeweiligen Flaschen entnommen und trypsiniert (vgl. Kap. 3.2.), die Zellen sodann in 15 ml MEM suspendiert und zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurde das Zellsediment in 2 ml MEM resuspendiert.

Ein Tropfen dieser Zellsuspension wurde zur Bestimmung des Avitalitätsindex auf einen Objektträger gegeben und mit einem Tropfen Lissamingrünlösung (1% Lissamingrün in physiologischer Kochsalzlösung; Chroma, Stuttgart) vermischt. Nach 5 min wurde das Verhältnis von gefärbten (avitalen) und nicht gefärbten (vitalen) Zellen in einer Gesamtpopulation von 1000 Zellen pro

Probe bestimmt. Als Avitalitätsindex wurde der Quotient

$$\text{Avitalitätsindex} = \frac{\text{Anzahl der gefärbten (avitalen) Zellen}}{\text{Gesamtzahl der Zellen}} \%$$

definiert.

Der Rest der Zellsuspension diente zur Bestimmung der Wachstumsreihe und wurde mit 2 ml 10%igem Formalin (gepuffert mit Na-cacodylat auf pH 7.2) fixiert. Mit Hilfe einer Zählkammer wurde die Zellzahl in dieser Lösung bestimmt. Aus dieser Zahl wurde dann die tatsächliche, in den Kulturflaschen vorhandene Zellzahl unter Berücksichtigung der Volumenzugabe beim Resuspendieren und Fixieren auf 1 ml Flascheninhalt zurückgerechnet und protokolliert. Der entscheidende Vorteil dieser relativ komplizierten Methode gegenüber dem direkten Auszählen der Zellzahl in der Kulturflasche liegt in der gleichmäßigen Zellverteilung in der Suspension, so daß das immer ungleichmäßige Wachstum der Zellen in der Monolayerkultur unberücksichtigt bleiben kann. Darüber hinaus ermöglicht die Fixierung und Konservierung ein zeitlich unabhängiges Auszählen, sowie eine mehrfache Bestimmung der Zellzahl und führt somit zu genaueren Werten.

### 3.5. Lichtmikroskopische Untersuchung

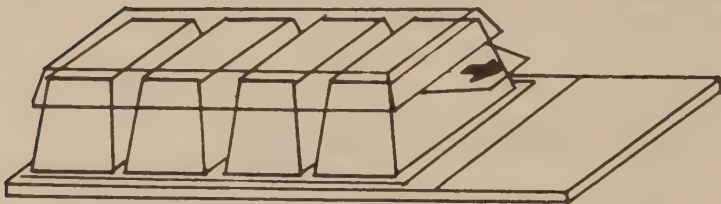
Die Konzentrationen und Zeitwerte der lichtmikroskopischen Untersuchung entsprechen völlig den Daten des Versuchsansatzes von Kapitel 3.4. Tabelle I gibt demnach auch für die lichtmikroskopische Untersuchung die experimentellen Daten wieder.

Allerdings wurden die Versuche nicht in den üblichen Kulturflaschen, sondern in LAB-TEK-Zellkulturobjektträgern (Abb. 2) durchgeführt (NEUMANN & BECHMANN<sup>30</sup>).

Es wurden Zellkulturobjektträger mit vier Kammern verwendet. Der Kammeraufsatz besteht aus einem durchsichtigen, nicht toxischen Kunststoffrahmen, der mit einem Deckel aus demselben

Material geschlossen und mittels einer Dichtungsmaske auf einem Glasobjektträger befestigt ist. Eine direkte Fixierung und Färbung des Zellrasens wird hierdurch möglich.

Jede der Kammern wurde mit 1 ml supplementiertem Medium gefüllt und mit  $1.5 \times 10^5$  Zellen beschickt. Die Substanzexposition erfolgte gemäß dem in Kapitel 3.4. geschilderten Versuchsablauf. Zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt wurden die LAB-TEK-Objektträger dann aus dem Brutschrank entnommen, das Medium abgegossen und der Zellrasen 15 min direkt in der Kammer mit  $-18^{\circ}\text{C}$  kaltem Aceton fixiert. Die anschließend luftgetrockneten Zellen wurden sodann 30 min lang mit Meyer's Hämalaunlösung gefärbt und in der aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Die Präparate wurden nicht mit Deckgläsern versehen, sondern direkt bei 650-facher Vergrößerung am Fotomikroskop betrachtet und fotografiert.



**LAB-TEK<sup>®</sup>**  
**Zellkultur-Objektträger**

Abb. 2: Der zur lichtmikroskopischen Untersuchung verwendete spezielle Zellkultur-Objektträger (Beschreibung im Text)

### 3.6. Elektronenmikroskopische Untersuchung

Der Versuchsansatz für die elektronenmikroskopische Untersuchung weicht vom bisher beschriebenen Versuchsaufbau ab und ist in Tabelle II niedergelegt. Die Unterschiede ergaben sich aus Vorversuchen. Hierbei zeigten sich bereits innerhalb der ersten 12 h nach Substanzgabe ultrastrukturell faßbare zelluläre Veränderungen, so daß mehrere Untersuchungszeitpunkte in das Intervall der ersten 12 h nach Substanzentfernung gelegt wurden. Auf eine elektronenmikroskopische Untersuchung nach Behandlung mit den höchsten Dosisschritten aus Tab. I wurde verzichtet, da sich hierbei ausschließlich völlig zerstörte Zellen finden ließen.

Der Ansatz der Zellen erfolgte wiederum in den üblichen Zellkulturflaschen mit einer Einsaat von  $1.5 \times 10^6$  Zellen pro Flasche.

Zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten wurden die Zellen der entsprechenden Flaschen mit 10 ml eines Fixationsgemisches nach KARNOVSKI, das aus 30 ml Glutaraldehydlösung (10%ig), 30 ml Cacodylatpuffer (0.2 M; pH 7.2), 40 ml Paraformaldehydlösung (7.5%ig) und 60 mg  $\text{CaCl}_2$  bestand, für eine Stunde fixiert und anschließend mehrfach mit Cacodylatpuffer gespült.

Die Zellen wurden dann von der Unterlage mechanisch abgeschabt, in einer Osmiumtetroxidlösung (1%  $\text{OsO}_4$  in 0.1 M Cacodylatpuffer) für eine Stunde nachfixiert, über die aufsteigende Alkoholreihe entwässert und anschließend in Mikropal (FERAK, Berlin) eingebettet. Die mit dem REICHERT-Ultramikrotom angefertigten Ultradünnschnitte wurden zunächst mit wäßriger 1%iger Uranylacetat-Lösung sowie mit Bleizitrat nach REYNOLDS<sup>35</sup> nachkontrastiert und dann im Elektronenmikroskop bei 2500- bis 30000-facher Vergrößerung betrachtet und 2- bis 4-fach fotografisch vergrößert.

| Substanz  | Konzentration        | Intervalle nach Substanzentfernung |
|-----------|----------------------|------------------------------------|
| Kontrolle |                      | 0, 12, 24, 48, 72 h                |
| TDC       | $5 \times 10^{-3}$ M | 0, 12, 24, 48, 72 h                |
|           | $5 \times 10^{-4}$ M |                                    |
|           | $5 \times 10^{-5}$ M |                                    |
| VDC       | $10^{-4}$ M          | 0, 12, 24, 48, 72 h                |
|           | $10^{-5}$ M          |                                    |
|           | $10^{-6}$ M          |                                    |
| DDP       | $5 \times 10^{-5}$ M | 0, 12, 24, 48, 72 h                |
|           | $5 \times 10^{-6}$ M |                                    |
|           | $5 \times 10^{-7}$ M |                                    |

Tabelle I : Experimentelle Bedingungen für die Bestimmung des Zellwachstums und des Avitalitätsindex, sowie für die lichtmikroskopische Untersuchung.

| Substanz  | Konzentration        | Intervalle nach Substanzentfernung |
|-----------|----------------------|------------------------------------|
| Kontrolle |                      | 0, 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72 h       |
| TDC       | $5 \times 10^{-4}$ M | 0, 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72 h       |
|           | $5 \times 10^{-5}$ M |                                    |
| VDC       | $10^{-5}$ M          | 0, 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72 h       |
|           | $10^{-6}$ M          |                                    |
| DDP       | $5 \times 10^{-6}$ M | 0, 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72 h       |
|           | $5 \times 10^{-7}$ M |                                    |

Tabelle II: Experimentelle Bedingungen für die elektronenmikroskopische Untersuchungen.

#### 4. Befunde

##### 4.1. Wachstumsverhalten

Das Wachstumsverhalten von unbehandelten embryonalen Fibroblasten, sowie von Fibroblasten im Anschluß an eine 90-minütige Behandlung mit den in Tabelle I angegebenen Konzentrationen von DDP, TDC, bzw. VDC ist in den Abbildungen 3 bis 5 dargestellt, wobei die Zunahme der Zellzahl gegenüber der Ausgangszellzahl als logarithmische Funktion in Abhängigkeit von der Expositionszeit aufgetragen ist.

##### 4.1.1. Wachstumsverhalten der unbehandelten Fibroblasten

Die unbehandelte Zellpopulation zeigt ein charakteristisches Wachstumsverhalten ohne erkennbare Auffälligkeiten: Nach einem relativ geringem initialen Anstieg der Zellzahl während der ersten 12 h kommt es regelmäßig bei allen Kontrollpopulationen zu einer Verdoppelung der Zellzahl innerhalb von 24 h. Entsprechend dem exponentiellen Wachstumsverhalten dieser Zellen vervielfachte sich innerhalb 72 h die Zellzahl um das 10- bis 12-fache, so daß zu diesem Zeitpunkt jeweils  $12 \times 10^5$  bis  $15 \times 10^5$  Zellen pro ml Nährmedium vorlagen. Die Plateauphase des Zellwachstums wird ebenfalls regelmäßig etwa zu diesem Zeitpunkt erreicht. Dies ist der Ausdruck der beginnenden Erschöpfung des Nährmediums. Die Versuche wurden daher zu diesem Zeitpunkt, also 72 h nach Versuchsbeginn abgebrochen (Abb. 3 bis 5).

##### 4.1.2. Wachstumsverhalten der Fibroblasten nach der Applikation von DDP

Bei der Betrachtung des Wachstumsverhaltens von Fibroblasten nach 90-minütiger Einwirkung von DDP (Abb. 3) lassen sich folgende Befunde erkennen:

Während die Zellen, die mit einer  $5 \times 10^{-7}$  M Lösung von DDP behandelt wurden, keinen Unterschied gegenüber dem Wachstum

der unbehandelten Kontrollzellen zeigten, stagnierte nach Behandlung mit einer  $5 \times 10^{-6}$  M Lösung von DDP die Zellzahl innerhalb der ersten 24 h. Danach allerdings kommt es wieder zu einem Anstieg der Zellenzahl, der jedoch innerhalb von 72 h lediglich Werte von  $6 \times 10^5$  Zellen pro ml Nährmedium ergibt. Das heißt, es liegt am Versuchsende nur die Hälfte der Zellzahl der unbehandelten Kontrollzellen vor.

Eine Erhöhung der DDP-Konzentration auf  $5 \times 10^{-5}$  M führt zu einem massiven Absinken der Zellzahl während des gesamten Beobachtungszeitraums.

#### 4.1.3. Wachstumsverhalten der Fibroblasten nach der Applikation von TDC

Bei der Betrachtung des Wachstumsverhaltens der mit TDC behandelten Zellen fallen zunächst die großen Konzentrationsunterschiede gegenüber DDP auf. Bei einer Konzentration von  $5 \times 10^{-5}$  M - hier lassen sich beim DDP keine Zellen mehr nachweisen - findet sich nach TDC-Behandlung ein völlig normales Wachstumsverhalten im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. (Abb. 4)

Erstmals bei einer Konzentration von  $5 \times 10^{-4}$  M TDC läßt sich eine Wachstumshemmung erkennen: Die Zellzahl steigt innerhalb von 72 h lediglich auf Werte von  $7.5 \times 10^5$  Zellen pro ml Nährmedium an; dies entspricht etwa der Hälfte der Zellzahl der Kontrollpopulation zu diesem Untersuchungszeitpunkt. Weniger ausgeprägt als nach DDP-Behandlung ist die Wachstumshemmung innerhalb der ersten 24 h nach Substanzentfernung; hier unterscheidet sich die Wachstumskurve nur geringfügig von der unbehandelten Kontrollpopulation.

Bei einer Konzentration von  $5 \times 10^{-3}$  M ist - ähnlich wie nach Gabe von  $5 \times 10^{-5}$  M DDP - keine Zunahme der Zellzahl, sondern sogar ein Absinken der Zellzahl innerhalb des Beobachtungszeitraums von 72 h erkennbar.

#### 4.1.4. Wachstumsverhalten der Fibroblasten nach der Applikation von VDC

Bei den mit VDC behandelten Zellen beobachtet man bereits bei einer Konzentration von  $10^{-6}$  M, d.h. bei einer wesentlich geringeren Konzentration als bei TDC, eine geringfügige Hemmung der Zellvermehrung im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollpopulationen. Bereits bei dieser Konzentration verläuft die Wachstumskurve im gesamten Beobachtungszeitraum zwar geringfügig, aber doch deutlich unterhalb der Kurve der Kontrollpopulation. Nach Ablauf von 72 h beträgt der Unterschied zwischen der Wachstumskurve der behandelten Zellen und der der unbehandelten Kontrollpopulation etwa 30%.

Bei einer Konzentration von  $10^{-5}$  M kommt es zu einer deutlichen Wachstumshemmung, die aber auch erst nach Ablauf von 48 h eindeutig nachzuweisen ist. Nach einem Zeitraum von 72 h liegt dann eine Zellzahl von  $4 \times 10^5$  Zellen pro ml Nährmedium vor, das sind etwa 70% weniger Zellen, als in der unbehandelten Kontrollpopulation zum gleichen Zeitpunkt.

Erhöht man die Konzentration schließlich auf  $10^{-4}$  M, so stellt sich wiederum ein massives Absinken der Zellzahl während des Beobachtungszeitraumes von 72 h ein.

Wachstumsverhalten  
von  
humanen embryonalen Fibroblasten  
nach  
 $\text{cis}-(\text{NH}_3)_2 \text{PtCl}_2$ -Behandlung

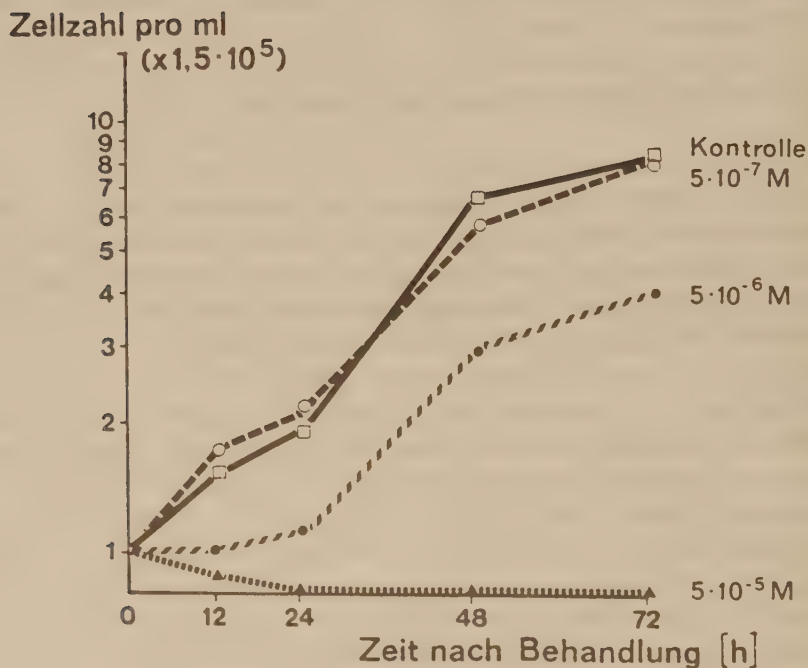


Abb. 3: Wirkung von DDP auf das Wachstumsverhalten embryonaler Fibroblasten. Die jeweilige Konzentrationen von DDP sind rechts an den Wachstumskurven aufgetragen. Die Werte wurden jeweils aus vier Kulturflaschen gewonnen und arithmetisch gemittelt.

Wachstumsverhalten  
von  
humanen embryonalen Fibroblasten  
nach  
(C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>TiCl<sub>2</sub>-Behandlung

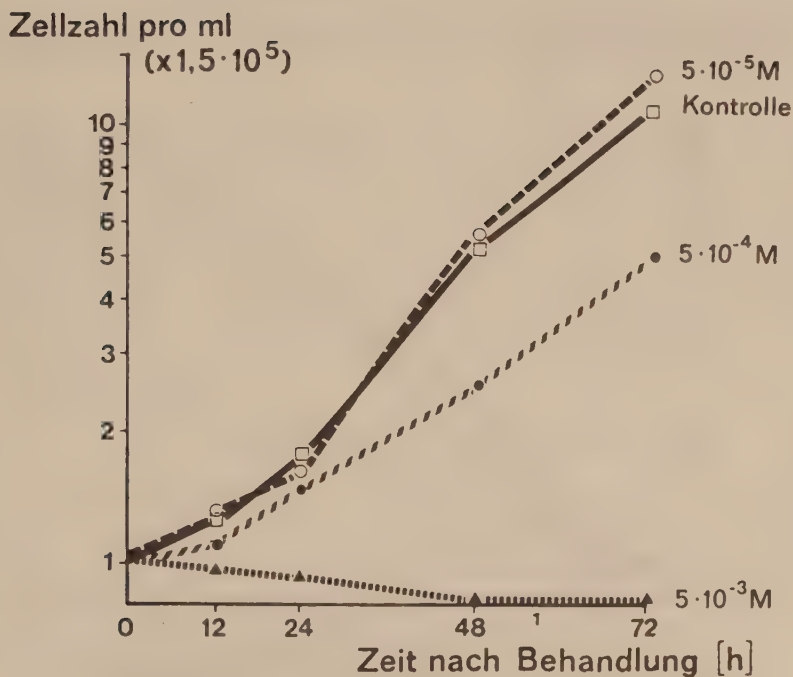


Abb. 4: Wirkung von TDC auf das Wachstumsverhalten embryonaler Fibroblasten (Einzelheiten siehe Abb. 3)

Wachstumsverhalten  
von  
humanen embryonalen Fibroblasten  
nach  
(C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>VCl<sub>2</sub>-Behandlung

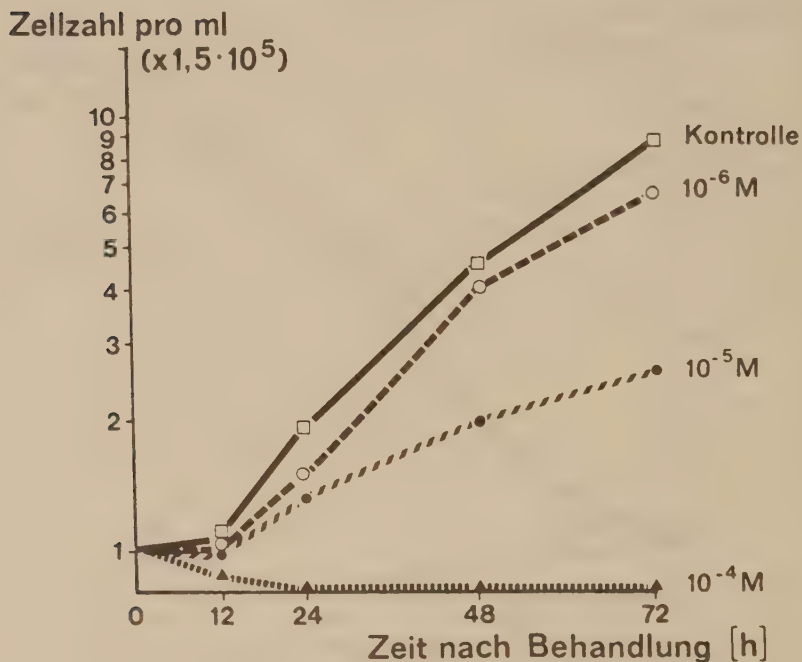


Abb. 5: Wirkung von VDC auf das Wachstumsverhalten von embryonalen Fibroblasten (Einzelheiten siehe Abb. 3)

#### 4.2. Bestimmung des Avitalitätsindex

Die Ergebnisse nach Ermittlung des Avitalitätsindex der unbehandelten, wie auch der mit DDP, TDC bzw. VDC behandelten Zellen sind in den Abbildungen 6, 7, 8 dargestellt. Der nach der in Kapitel 3.4. beschriebenen Methode bestimmte Avitalitätsindex ist definitionsgemäß der Quotient

$$\text{Avitalitätsindex} = \frac{\text{Anzahl der gefärbten (avitalen) Zellen}}{\text{Gesamtzahl der Zellen}}$$

und wird in Prozentzahlen angegeben. Einschränkend ist hier jedoch zu erwähnen, daß mit der Lissamingrünfärbung nach HOLMBERG<sup>12</sup> nicht nur avitale, sondern auch irreversibel geschädigte, aber noch vitale Zellen erfaßt werden. Nach HOLMBERG<sup>12</sup> ist aber eine derartige Schädigung in jedem Falle die Vorstufe der Nekrose. Deshalb wird im Rahmen dieser Arbeit auf eine derartige Differenzierung nicht eingegangen, alle gefärbten Zellen werden als avital bezeichnet.

##### 4.2.1. Avitalitätsindex unbehandelter Fibroblasten

Bei der Beurteilung der unbehandelten Fibroblasten sind in allen untersuchten Kontrollkulturen kaum gefärbte Zellen zu finden. Als Maximalwerte lassen sich hierbei lediglich 1 bis 3% avitale Zellen nachweisen (Abb. 6 bis 8)

##### 4.2.2. Avitalitätsindex embryonaler Fibroblasten nach DDP-Behandlung

Nach Behandlung mit DDP in einer Konzentration von  $5 \times 10^{-5}$  M zeigt sich, daß bereits unmittelbar nach der 90-minütigen Behandlung annähernd 90% avitale Zellen vorliegen. Dieser anteil steigt in den folgenden Untersuchungszeiträumen auf annähernd 100% avitaler Zellen an. (Abb. 6)

Bei der niedrigen Konzentration von  $5 \times 10^{-6}$  M liegen unmittelbar nach der Behandlung immerhin ca. 30% avitale Zellen vor. Der Anteil erhöht sich binnen 24 h auf 45%, um sich dann im gesamten weiteren Beobachtungszeitraum auf 40 bis 45% einzupendeln.

Bei einer Konzentration von  $5 \times 10^{-7}$  M liegen unmittelbar nach der Behandlung ebenfalls 30% irreversibel geschädigte Zellen vor. Innerhalb von 12 h erfolgt ein Anstieg auf 42% dann erfolgt jedoch ein leichter Abfall und der Anteil avitaler Zellen verbleibt in den folgenden Beobachtungszeiträumen im Bereich zwischen 30 und 35%. (Abb. 6)

#### 4.2.3. Avitalitätsindex embryonaler Fibroblasten nach TDC-Behandlung

Nach der Behandlung mit TDC ergibt sich bei einer Konzentration von  $5 \times 10^{-3}$  M bereits unmittelbar nach der 90-minütigen TDC-Inkubation, der Befund, daß 95% aller Fibroblasten avital sind. Innerhalb von 12 h steigt dieser Anteil auf 100%, d.h. zu diesem Zeitpunkt lassen sich überhaupt keine vitalen Zellen mehr nachweisen (Abb. 7).

Bei einer TDC-Konzentration von  $5 \times 10^{-4}$  M erkennt man zu Beginn des Beobachtungszeitraumes annähernd 30% avitale Zellen. Dieser Wert erhöht sich dann binnen 72 h auf 40%, wohingegen nach Behandlung mit einer  $5 \times 10^{-5}$  M TDC-Lösung ein Abfall des Anteils avitaler Zellen von anfänglich 35% auf 28% nach 72 h verfolgt werden kann.

#### 4.2.4. Avitalitätsindex embryonaler Fibroblasten nach VDC-Behandlung

Die Beurteilung des Avitalitätsindex nach Behandlung mit VDC in der höchsten untersuchten Konzentration von  $10^{-4}$  ergab dasselbe Bild, wie bei den anderen untersuchten Substanzen DDP und TDC. Auch hier sind 12 h nach Behandlungsende ebenso wie zu

den späteren Beobachtungszeitpunkten keine vitalen Zellen mehr anzutreffen.

Bei einer Konzentration von  $10^{-5}$  M ergibt sich ein Anstieg von 30% unmittelbar nach Behandlungsende auf 48% nach 72 h.

Bei einer Konzentration  $10^{-6}$  M liegen nach Beendigung der Behandlung 18% avitaler Zellen vor. Es erfolgt ein Anstieg, der seinen Gipfel 48 h später mit 33% erreicht und dann bis zum Zeitpunkt von 72 h wieder auf 29% abfällt.

**Avitalitätsindex  
von  
humanen embryonalen Fibroblasten  
nach  
 $\text{cis}-(\text{NH}_3)_2 \text{PtCl}_2$ -Behandlung**

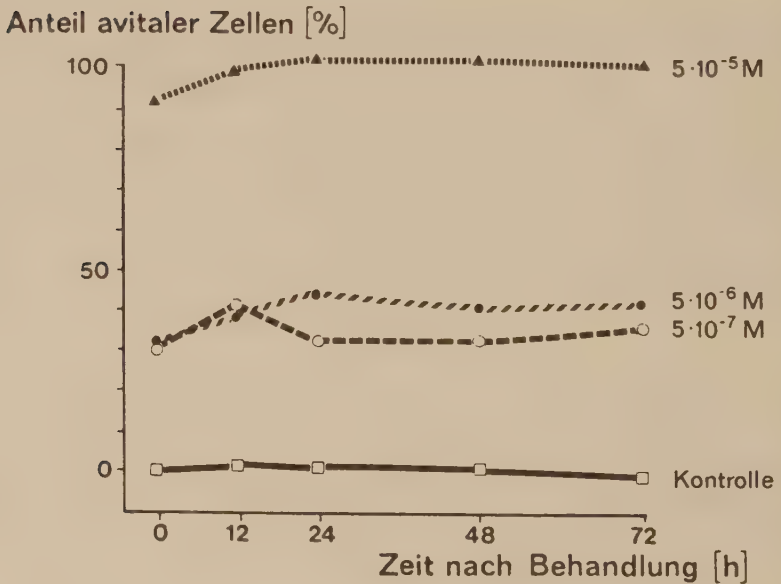


Abb. 6: Avitalitätsindices embryonaler Fibroblasten nach DDP-Behandlung. Rechts die jeweils getesteten Substanzkonzentrationen.

Avitalitätsindex  
von  
humanen embryonalen Fibroblasten  
nach  
( $C_5H_5$ ) $_2TiCl_2$ -Behandlung

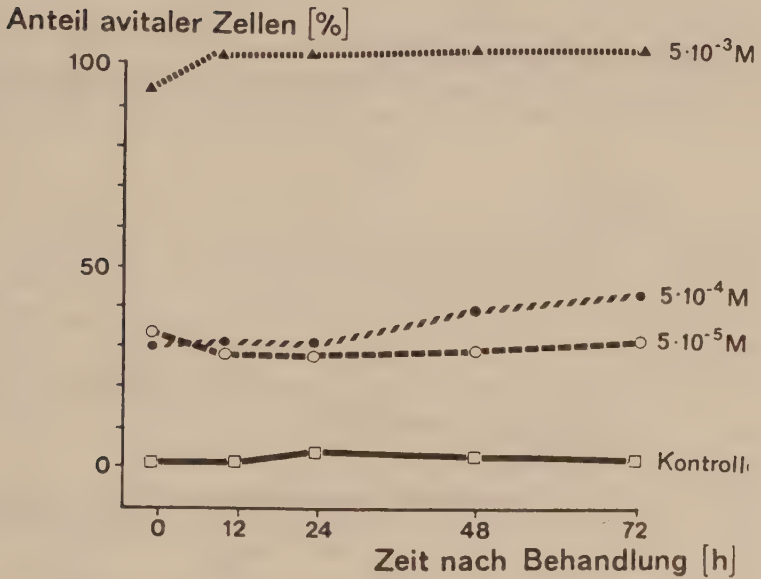


Abb. 7: Avitalitätsindices embryonaler Fibroblasten nach TDC-Behandlung. Rechts die jeweils getesteten Substanzkonzentrationen.

Avitalitätsindex  
von  
humanen embryonalen Fibroblasten  
nach  
( $C_5H_5$ ) $_2VCl_2$ -Behandlung

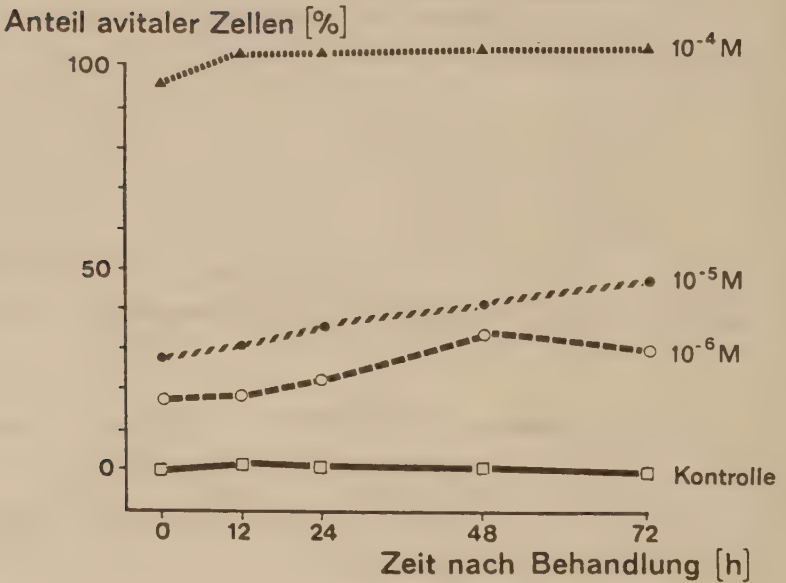


Abb. 8: Avitalitätsindices embryonaler Fibroblasten nach VDC-Behandlung. Rechts die jeweils getesteten Substanzkonzentrationen.

#### 4.3. Lichtmikroskopische Befunde

##### 4.3.1. Beschreibung der unbehandelten Zelle

Die normalstrukturierten embryonalen Fibroblasten stellten sich lichtmikroskopisch als polygonale oder spindelförmige Zellen dar. Das Zytoplasma erscheint als feingranulierte Grundsubstanz, wobei sich jedoch in Kernnähe eine feinwabige Struktur ausbildet. Die Zytoplasmamembran ist als zarte Verdichtungslinie zu erkennen. Dünne Fortsätze des Zelleibes, deren gesamte Ausdehnung lichtmikroskopisch meist nicht darstellbar ist, charakterisieren diese Zellen besonders. Gelegentlich läßt sich lichtmikroskopisch nachweisen, daß die Fibroblasten über diese Fortsätze untereinander in Verbindung stehen (Abb. 9). Weitere Strukturen lassen sich lichtmikroskopisch im Zytoplasma nicht erkennen.

Die unbehandelten Zellen enthalten zu jedem Untersuchungszeitpunkt (Siehe Tab. I) stets nur einen Kern von rundlicher bis ovaler Gestalt. Bei den spindelförmigen Zellen liegt er etwa in der Mitte des Zytoplasmas, beim polygonalen Zelltyp eher exzentrisch im Zelleib. Die Kernmembran ist deutlich als kräftig gefärbte Struktur zu erkennen. Sie imponiert jedoch nicht als gleichmäßige Verdichtungslinie, sondern weist Zonen stärkerer und schwächerer Anfärbbarkeit auf, die sich abwechseln. So entsteht das Bild einer aus vielen Einzelpunkten aufgebauten Linie.

Die Nukleoli zeigten sich in vielfältiger Gestalt. Meist sind es kräftig gefärbte, längliche Strukturen, die im Verhältnis zum Karyoplasma relativ wenig Raum beanspruchen. Es ist zu beachten, daß bei den unbehandelten Zellen zu keinem Beobachtungszeitpunkt ein runder, abgekugelter und scharf begrenzter Nukleolus zu finden ist. Der Übergang des Nukleolus zum Karyoplasma ist lichtmikroskopisch nicht eindeutig darstellbar. Auch die Anzahl der Nukleoli schwankt erheblich, meist liegen jedoch 1 bis 3 Nukleoli im Kern vor (Abb. 9, 10).

Diese Polymorphie der Nukleoli wurde schon von SOCKINGER<sup>42,43</sup> und BIERLING<sup>6</sup> beschrieben und dürfte charakteristisch für die hier verwendeten embryonalen Fibroblasten zu sein.

#### 4.3.2. Beschreibung der mit VDC behandelten Zellen

Als auffälligstes Ergebnis ist zunächst anzuführen, daß die beiden untersuchten Konzentrationsschritte von  $10^{-5}$  M und  $10^{-6}$  M zu jeweils gleichen morphologischen Veränderungen während des gesamten Beobachtungszeitraums führen. Die im folgenden chronologisch aufgeführten Ergebnisse sind also für beide Konzentrationsschritte gültig.

##### Nach 12 h

Nach Ablauf dieses Zeitraums zeigen sich morphologisch noch keine intrazellulären Veränderungen. Es fällt jedoch auf, daß die behandelten Populationen im Gegensatz zur unbehandelten Fibroblastenpopulation zahlreiche Prophasezellen beinhaltet, wohingegen sich andere Mitoseformen nicht finden lassen.

Die Prophasezellen sind durch folgende Veränderungen ihrer Kernstruktur charakterisiert: Im Kern treten umschriebene Verdichtungen auf, die unmittelbar neben optisch leeren Bezirken im Kern liegen (Abb. 11). Das Chromatin scheint zu Fäden und Klumpen zusammenzufließen. Auch an der Innenseite der Kernmembran zeigen sich stärkere Verdichtungen. Diese Veränderungen sind eindeutig als Beginn der Mitose zu interpretieren (GRUNDMANN<sup>9</sup>). Obwohl die Zahl der Prophasezellen in der vorliegenden Arbeit nicht quantitativ bestimmt wurde, läßt sich doch die Aussage machen, daß der prozentuale Anteil der Prophasezellen zu diesem Untersuchungszeitpunkt um ein Vielfaches größer ist als bei den unbehandelten Zellen.

#### Nach 24 h

Zu diesem Untersuchungszeitpunkt zeigen sich bereits deutliche Veränderungen in der intrazellulären Struktur der Fibroblasten (Abb.12):

Der Kern beginnt sich einzuschnüren, wobei trotz der beginnenden Kernlappung stets Verbindungen zwischen den einzelnen Segmenten nachzuweisen sind, d.h. es liegt zu diesem Zeitpunkt immer nur ein Kern pro Zelle vor.

Das Chromatin und die Karyolymphe sind unauffällig und unterscheiden sich in ihrer Struktur nicht von der unbehandelten Zelle. Verändert hat sich jedoch die Gestalt des Nukleolus. Aus dem unregelmäßig geformten, länglichen Kernkörperchen der unbehandelten Zelle wird ein rundlicher, gleichsam abgekugelter Nukleolus, der wesentlich stärker angefärbt erscheint als in der unbehandelten Zelle.

Auch im Zytoplasma zeigen sich Veränderungen. Die feinen Zytoplasmafortsätze an der Zelloberfläche, die ja ein besonderes Charakteristikum der unbehandelten Zelle sind, können jetzt kaum noch nachgewiesen werden. Dadurch erscheinen die Zellen plumper. Bei zahlreichen Fibroblasten finden sich außerdem stärkere Verdichtungszone im Zytoplasma. Insbesondere in Kernnähe lassen sich diese stärker anfärbbaren Strukturen deutlich erkennen (Abb.12).

#### Nach 48 h

Die bereits zum Untersuchungszeitpunkt von 24 h zu beobachtende Kernlappung verstärkt sich und führt so weit, daß schließlich das Bild von mehrkernigen Zellen entsteht (Abb.13). Ob diese Kerne untereinander durch dünne Karyoplasmabrücken miteinander verbunden sind, oder ob wirklich mehrere voneinander völlig getrennte Kerne vorliegen, läßt sich durch Analyse der

lichtmikroskopischen Befunde nicht eindeutig klären. Die Nukleoli sind wie zum vorhergehenden Untersuchungszeitpunkt abgekugelt und sehr stark anfärbbar. An der Innenseite der Karyoplasamembran einzelner Zellen scheinen sich Chromatinklumpchen anzulagern.

Die Zytoplasmafortsätze an der Zelloberfläche sind ebenfalls nur noch selten vorhanden. Die durchschnittliche Größe der einzelnen Zelle ist trotz der Mehrkernigkeit unverändert, durch die wenig ausgeprägten Zellfortsätze erscheinen die Fibroblasten eher etwas kleiner.

#### Nach 72 h

Zu diesem Untersuchungszeitpunkt zeigt sich bei der lichtmikroskopischen Betrachtung das vielfältigste Bild. Es finden sich zahlreiche mehrkernige Zellen der gleichen Gestalt, wie bereits zum Zeitpunkt von 48 h beschrieben. In anderen Zellen zeigt das Karyoplasma wieder die völlig unauffällige Struktur von unbehandelten Zellen. Lediglich die Nukleoli sind nach wie vor abgekugelt und stark färbbar. Diese Abkuglung und optische Verdichtung bleibt also als besonderes Charakteristikum den ganzen Beobachtungszeitraum hindurch erhalten.

Daneben kommen aber auch Zellen vor, deren Karyoplasma prophaseartige Chromatinklumpungen aufweist (Abb.14), ebenso wie auch Zellen, deren Kern deutlich aufgehellte erscheint (Abb.15). Diese Erscheinung findet man vor allem bei Zellen, die mehr als drei Einzelkerne enthalten. Das Zytoplasma dieser Zellen ist häufig vakuolig degeneriert.

Zum Zeitpunkt von 72 h treten auch Zellen auf, die einen meist sehr großen Kern enthalten und etwa doppelt so groß wie unbehandelte Fibroblasten sind. Die Struktur des in diesen Zellen immer nur singular auftretenden Kernes zeichnet sich durch ein sehr stark anfärbbares, grobscholliges Netzwerk aus, das nur entfernt an die Chromatinklumpungen von Prophasezellen erin-

nert (Abb.16). Der abgekugelte Nukleolus erscheint in diesen Zellen sehr groß. Das Zytoplasma dieser einkernigen Riesenzellen scheint besonders in Kernnähe optisch dichter zu sein, als bei den unbehandelten Zellen. Auch sind dunkle, streifenförmige Einlagerungen im Zytoplasma deutlich zu erkennen. Dieser Zelltyp kommt nicht sehr häufig vor, beachtenswert ist jedoch die Konstanz seiner morphologischen Charakteristika, die sich eindeutig bei jeder dieser einkernigen Riesenzellen nachweisen lassen.

4.3.3. Beschreibung der mit DDP und TDC behandelten  
embryonalen Fibroblasten

Bei der lichtmikroskopischen Untersuchung der mit TDC und DDP behandelten Zellen und deren Vergleich mit den Fibroblasten, die mit VDC behandelt wurden, stellt sich heraus, daß bezüglich der behandlungsinduzierten morphologischen Veränderungen keine erkennbaren Unterschiede zu beobachten sind. Auch hier fällt nach 12 h die große Zahl der Prophasezellen auf. Die Einschnürungen des Kerns bis hin zur Mehrkernigkeit im Zeitraum von 24 bis 48 h nach Behandlungsende ohne Vergrößerung des Zellvolumens ist ebenfalls eindeutig nachzuweisen. Auch das morphologisch bunte Bild zum Untersuchungszeitpunkt von 72 h entspricht den Ergebnissen, die sich nach Behandlung mit VDC ergeben. Mehrkernige Zellen mit sehr unterschiedlich strukturierten Kernen, Abkugelungen der Nukleoli und auch vereinzelt auftretende einkernige Riesenzellen bestimmen zu diesem Zeitpunkt das lichtmikroskopische Bild nach Behandlung mit DDP und TDC.

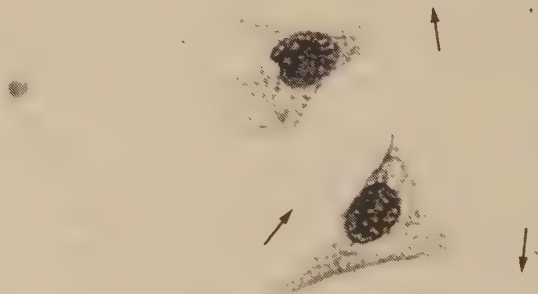


Abb. 9: Normalstrukturierte, unbehandelte Fibroblasten. Polygonale Gestalt der Zellen mit zarten Zytoplasmafortsätzen (Pfeile). Polymorphe Nukleoli in beiden Zellen.

Verg. 1000 x

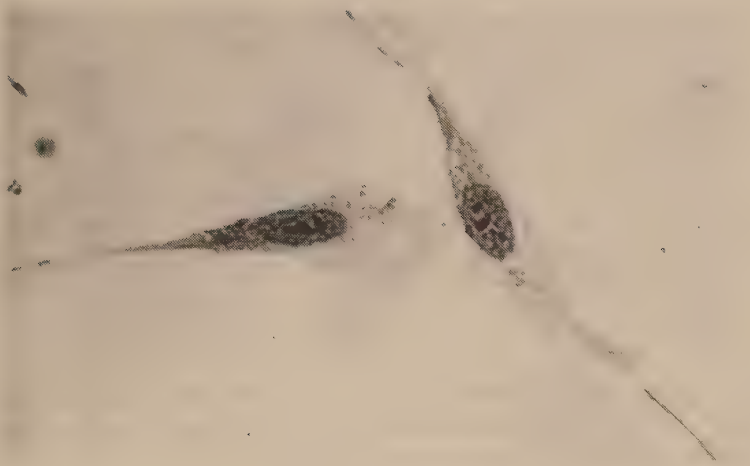


Abb. 10: Unbehandelte Fibroblasten. Polygonaler und spindelförmiger Zelltyp. Auch hier Nukleoli unterschiedlicher Gestalt und Anzahl.

Vergr. 1000 x



Abb. 11: Fibroblasten 12 h nach VDC-Behandlung ( $10^{-5}$  M). Reichlich Prophasezellen (Pro) mit klumpenartig verdichtetem Chromatin.

Vergr. 1000 x



Abb. 12: Fibroblasten 24 h nach VDC-Behandlung ( $10^{-5}$  M). Beginnende Kernsegmentierung (KSg), Abkuglung der Nukleoli, verdichtete Zytoplasmazone in Kernnähe.

Vergr. 740 x

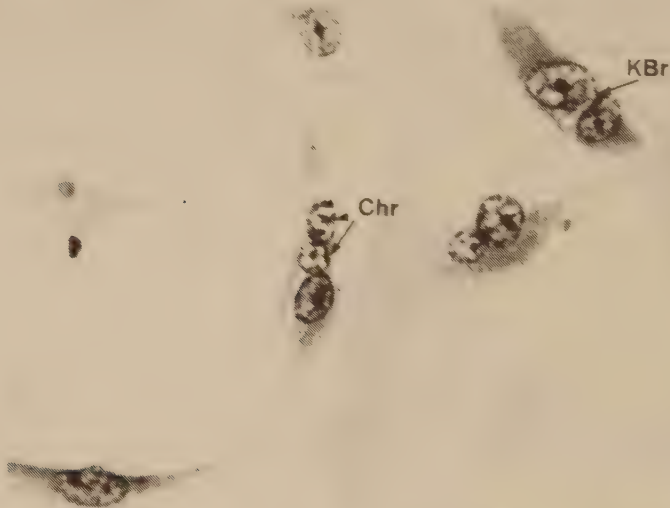


Abb. 13: Fibroblasten 48 h nach VDC-Behandlung ( $10^{-5}$  M). Mehrkernige Zellen, teilweise noch Karyoplasmaabücken zu erkennen (KBr). Chromatinklumpungen an der Kernmembraninnen-seite (Chr).

Vergr. 740 x

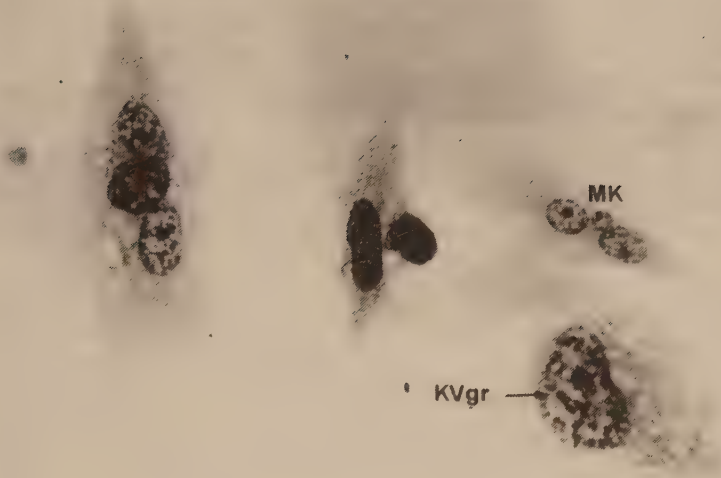


Abb. 14: Fibroblasten 72 h nach VDC-Behandlung ( $10^{-5}$  M).

Polymorphes Zellbild:

rechts eine mehrkernige Zelle mit drei Kernen; ob Karyoplasma-brücken vorhanden sind, ist nicht eindeutig zu erkennen. Die Kerne besitzen normal strukturiertes Karyoplasma (MK).

Darunter eine Zelle mit Kernvergrößerung (KVgr) und deutlich erkennbarer Chromatinklumpung im Karyoplasma.

In allen Zellen finden sich in den Kernen abgekugelte, stark angefärbte Nukleoli.

Vergr. 740 x

Abb. 15: Fibroblast 72 h nach  
Behandlung mit VDC ( $10^{-5}$  M).  
Zahlreiche aufgehellte Kerne,  
ebenfalls zahlreiche kleine Va-  
kuolen im Zytoplasma. Die Nu-  
kleoli erscheinen abgekugelt.  
Vergr. 740 x

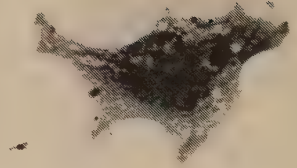


Abb. 16: Fibroblasten 72 h nach  
Behandlung mit VDC ( $10^{-5}$  M). Ein-  
kernige Riesenzelle mit exzentrisch  
gelegenen Kern. Grobschollige Struk-  
turen im Zytoplasma. Extrem großer,  
abgekugelter Nukleolus. Streifen-  
förmige Einlagerung (St) im Zyto-  
plasma, das insgesamt relativ dunkel  
erscheint.  
Vergr. 1000 x



#### 4.4. Elektronenmikroskopische Befunde

##### 4.4.1. Beschreibung der unbehandelten Zelle

Bei der Betrachtung der unbehandelten embryonalen Fibroblasten im Elektronenmikroskop zeigen sich diese als spindelförmige Zellen mit einem meist zentral gelegenen ovalen Kern.

Die Zytoplasmamembran stellt sich als elektronendichte, verhältnismäßig glatte Linie dar. Starke Einbuchtungen, Faltenbildungen oder ausgeprägte Oberflächenkräuselungen sind bei unbehandelten Zellen zu keinem Untersuchungszeitpunkt zu beobachten; kleinere, halbkugelige Einbuchtungen der Zytoplasmamembran als Ausdruck von Endo- bzw. Exozytoseprozessen sind jedoch des öfteren zu finden. Die Kontakte der einzelnen Zellen untereinander sind nicht sehr ausgeprägt, die Zellen liegen zumeist einzeln vor. Betrachtet man jedoch mehrere, untereinander in Verbindung stehende Zellen, so erkennt man, daß sich diese Zellen nur an verhältnismäßig kleinen, unscheinbaren Arealen berühren (Abb.17), wobei es an diesen Stellen zu einer dichten Annäherung der Zytoplasmamembranen kommt, ohne daß jedoch Strukturen lokaler Differenzierung im Bereich der angrenzenden Zytoplasmaabschnitte zu erkennen sind; dieses Fehlen spezifischer Zellkontakte darf durchaus als typisch für Fibroblasten in der Zellkultur angesehen werden (SCHARLACH & ZIMMERMANN<sup>37</sup>).

Die morphologisch auffälligste Struktur im Zytoplasma der Fibroblasten ist das endoplasmatische Retikulum (ER), (Abb.17,20,23). Es stellt sich als grobmaschiges, labyrinthartiges Netzwerk untereinander anastomosierender Röhren von verhältnismäßig gleichmäßigem Durchmesser dar, das kleinere oder größere Zytoplasmaareale inselartig umschließt. Diese Röhrensysteme des ER werden von einfachen Membranen begrenzt, der Innenraum ist mit einer homogen erscheinenden Masse angefüllt, an der Außenseite der Membranen sind viele kleine, sehr elektronendichte Granula, die Ribosomen, angeheftet. Es han-

delt sich also bei diesen Strukturen um die granuläre oder rauhe Form des ER (rER).

In enger räumlicher Beziehung zum rER stehen die Mitochondrien. Sie finden sich häufig in den vom rER umschlossenen Zytoplasmainseln, kommen aber auch in anderen Zytoplasmaabschnitten vor. Die Mitochondrien sind durch ihre charakteristische Struktur einfach zu erkennen (Abb.20,21):

Eine äußere Membran umschließt die Zellorganelle, es folgt nach innen ein enger Spaltraum und dann eine Membran, die zahlreiche, in den Innenraum des Mitochondriums hineinragende Falten ausbildet, die sogenannten cristae mitochondrales. Die Mitochondrien der unbehandelten Zelle sind verhältnismäßig klein (1 bis 3  $\mu\text{m}$ ) und zeichnen sich fast immer durch regelmäßige nierenförmige oder ovale Gestalt aus.

In der Grundstruktur des Zytoplasmas sind weiterhin kleine, deutlich erkennbare Granula zu sehen, die teilweise in kleinen Gruppen zusammengelagert sind, aber auch solitär vorkommen können (Abb.23). Sie sind morphologisch identisch mit den bereits bei der Beschreibung des rER aufgeführten Ribosomen und werden auf Grund ihrer Lage im Zytoplasma als freie Ribosomen bezeichnet.

In Kernnähe finden sich weiterhin Strukturen, die aus auffällig parallel angeordneten Membransystemen bestehen (Abb.19) und Strukturen des GOLGI-Apparates darstellen. Diese Membransysteme bilden schmale, zysternenartige Räume, die stapelförmig übereinander gelagert sind. Innerhalb eines Fibroblastenschnittes finden sich meist ein bis drei, selten auch mehr Stapel dieser GOLGI-Zisternen, wobei jeder Stapel im allgemeinen aus drei bis fünf übereinanderliegenden Doppelmembransystemen besteht.

Neben diesen wichtigsten Organellen finden sich in einigen Zellen deutlich sichtbare, elektronendichte, kugelförmige Einschlüsse ohne Membranbegrenzung, die als Fetttropfen inter-

pretiert werden dürften. Darüber hinaus sind auch kleine, optisch leere Vakuolen in vielen Zellen zu sehen.

Der ovale Kern ist von einer deutlich zu erkennenden Doppelmembran begrenzt, die an mehreren Stellen durch Kernporen unterbrochen ist (Abb.19). An der Innenseite dieser Doppelmembran findet sich in fast allen Kernen eine dünne Schicht kondensierten Chromatins, die an zahlreichen Stellen unterbrochen ist, so daß das Bild zarter, plaqueartiger Auflagerungen an der Kerninnenseite entsteht. Daneben sind im gesamten Karyoplasma verteilt feine Chromatinklumpungen zu sehen (Abb.18,23).

Der Nukleolus der unbehandelten Zelle ist annähernd rund und stellt sich in der Regel als Knäuel bandförmiger, sehr elektronendichter Strukturen dar. Dieses elektronenoptisch dichte Netzwerk, das Nukleolonema, umschließt mehrere kleinere annähernd rundliche Areale von geringerer Elektronendichte, die als pars amorpha des Nukleolus bezeichnet werden.

Diese Strukturen, die die in der vorliegenden Studie verwendeten unbehandelten embryonalen Fibroblasten charakterisieren, sind auch von anderen Autoren beschrieben worden, so von LENTZ<sup>28</sup> und entsprechen damit den vorhandenen Literaturangaben (Abb.23).



Abb. 17: Mehrere embryonale menschliche Fibroblasten (unbehandelt) in typischer Spindelform. Im Zytoplasma deutlich zu erkennen das rauhe endoplasmatische Retikulum (rER). In der mittleren Zelle ist im Zellkern ein typischer Nukleolus zu sehen, die Chromatinauflagerungen an der Innenseite der Kernmembran treten deutlich hervor.

Vergr. 12 500 x



Abb. 18: Text siehe nächste Seite

Text zu Abb.18: Ausschnitt aus Abb.19. Das Kontaktverhalten benachbarter Fibroblasten ist erkennbar. Typische Aneinanderlagerung ohne Ausbildung spezifischer Zellkontakte. Im Zellkern charakteristischer Nukleolus, sowie Chromatinklumpungen (Pfeile).

Vergr. 32 000 x

Abb. 19: Bei diesem Schnitt durch einen embryonalen Fibroblasten ist deutlich die an mehreren Stellen durch Kernporen (KP) unterbrochene Kernmembran zu erkennen. Im oberen Bildteil sind die typisch stapelförmig gelagerten GOLGI-Zisternen zu sehen (GA).

Vergr.22 000 x

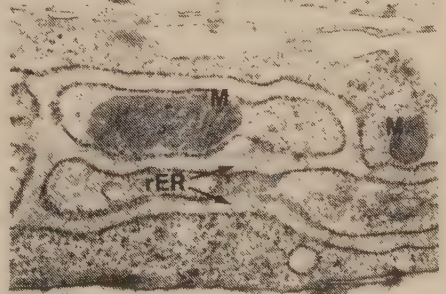
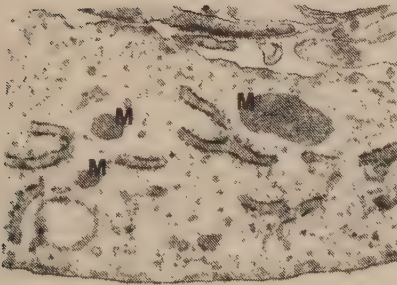
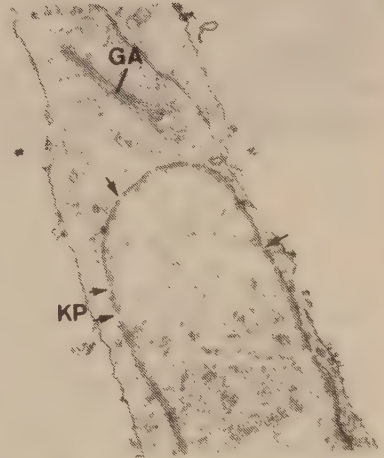


Abb. 20

An diesen Schnitten fallen neben Strukturen des rauhen endoplasmatischen Retikulums (rER) vor allem die Mitochondrien mit ihrer typischen Ultrastruktur auf.

Vergr. 36 000 x

Abb. 21

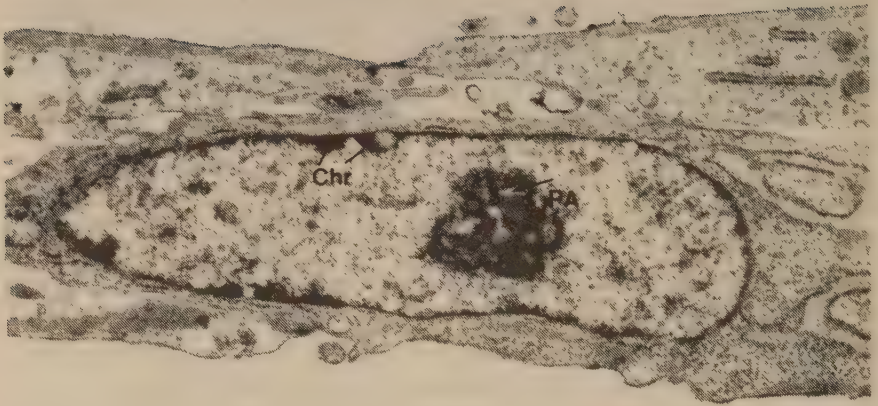


Abb. 22: Typische Gestalt des Zellkerns eines unbehandelten Fibroblasten. An der Innenseite der Kernmembran Chromatinauflagerungen (Chr), im Nukleolus deutlich sichtbar das Nukleolomena (N) und die pars amorpha (PA)

Vergr. 30 000 x

Text zu Abb.23 (nächste Seite):

Schematische Darstellung der Ultrastruktur eines menschlichen Fibroblasten; rauhes endoplasmatisches Retikulum (ER), Vakuolen (Vac), Tonofilamente (Tf), GOLGI-Apparat (G) (Nach LENTZ<sup>28</sup>).



Abb. 23: Elektronenmikroskopische Darstellung eines Fibroblasten nach LENTZ<sup>28</sup>. Erläuterungen siehe S.51.

#### 4.4.2. Beschreibung der mit VDC behandelten Zellen

##### 4.4.2.1 Befunde nach Behandlung mit $10^{-6}$ Mol VDC/l

###### Nach 0 h

Unmittelbar nach der 90-minütigen VDC-Behandlung sind erwartungsgemäß nur geringe Veränderungen nachweisbar. Es finden sich jedoch einige Zellen, die zu diesem Zeitpunkt bereits zahlreiche Vakuolen aufweisen. Bemerkenswert ist auch eine Veränderung in der Gestalt der Mitochondrien. Sie erscheinen elektronentransparenter als die Mitochondrien von unbehandelten Fibroblasten. Die Gestalt dieser Zellorganellen, die bei unbehandelten Zellen oval und regelmäßig ist, wird sehr unregelmäßig. Diese Veränderung bleibt auch zu späteren Beobachtungszeitpunkten bis zum Versuchsende bestehen (Vgl. Abb. 27). Die Anzahl der Mitochondrien pro Zelle scheint sich zunächst jedoch nicht von derjenigen unbehandelter Zellen zu unterscheiden.

###### Nach 3 h

Die Vakuolisierung innerhalb der Zellen wird jetzt stärker. Die einzelnen Zisternen des rER erweitern sich, wohingegen verstärktes Auftreten des rER zu diesem Untersuchungszeitpunkt noch nicht nachzuweisen ist. Zahlreiche Zisternen des GOLGI-apparates sind jetzt im Zytoplasma erkennbar, daneben läßt sich aber auch eine Zunahme der Golgivesikel feststellen; die Aktivität des Golgi-Apparates scheint demnach erhöht zu sein.

Das Karyoplasma wird transparent, es erscheint wesentlich durchsichtiger als das der unbehandelten Zelle. An der Innenseite der Kernmembran sind nur noch selten Chromatinklumpungen zu erkennen.

#### Nach 6 h

Die bereits zu den vorhergehenden Zeitpunkten erhobenen Befunde stellen sich jetzt sehr deutlich dar (Abb. 24, 25). So sind die Mitochondrien wie zu Beginn der Untersuchung vergrößert, aufgequollen und ihre Innenstruktur erscheint oft homogen, die cristae mitochondrales sind häufig nicht mehr zu erkennen. Die Zisternen des rER nehmen nun auch zahlenmäßig im Vergleich zur unbehandelten Zelle zu, teilweise erfüllen sie das ganze Zytoplasma. Neben zahlreichen kleinen Vakuolen finden sich nach wie vor zahlreiche stark ausgeprägte GOLGI-apparate (Abb. 24, 25). Auch die erhöhte Transparenz des Karyoplasmas und das Fehlen von Heterochromatin an der Kernmembraninnenseite ist nachzuweisen. Die Struktur des Nukleolus erscheint verschwommen, er scheint sich von seinem Zentrum weg ins Karyoplasma auszubreiten. Gegenüber der unbehandelten Zellen fehlt die klare Begrenzung des Nukleolus, ein Befund der sich auch mit den lichtmikroskopischen Ergebnissen deckt (Abb. 26).

#### Nach 9 h

Jetzt ist auch eine zahlenmäßige Zunahme der morphologisch veränderten Mitochondrien eindeutig feststellbar. Die Anzahl der cristae mitochondrales innerhalb der einzelnen Mitochondrien scheint gegenüber denen der unbehandelten Zelle geringer zu sein (Abb. 27).

#### Nach 12 h bis 72 h

Das zum Untersuchungszeitpunkt von 12 h noch sehr stark ausgeprägte rER nimmt in den folgenden Beobachtungszeiträumen wieder ab, ja teilweise erscheint es, als ob das rER 72 h nach Behandlung geringer ausgeprägt ist als bei der unbehandelten Zelle. Es finden sich jetzt auch zahlreiche Fibroblasten, die irreversible degenerative Veränderungen aufweisen:

Teilweise sind die Kernmembranen aufgelöst, andere Zellen weisen viele und ausgedehnte Vakuolen auf, auch verschiedene

Formen der Zellauflösung sind zu erkennen. Andere Zellen kehren in ihrer Gestalt jedoch wieder völlig in ihre ursprüngliche Form zurück, und lassen sich nicht von unbehandelten Zellen unterscheiden. Bemerkenswert sind die geringfügigen Kernveränderungen während des gesamten Beobachtungszeitraums. Nach Behandlung mit der Konzentration  $10^{-6}$  M scheinen sich die behandlungsbedingten Veränderungen noch deutlicher auf das Zytoplasma zu beschränken.

#### 4.4.2.2. Befunde nach Behandlung mit $10^{-5}$ Mol VDC/l

##### Nach 0 h

Auch hier zeigen sich am Ende der 90-minütigen Exposition kaum Veränderungen gegenüber der unbehandelten Zelle. Im Gegensatz zu der niedrigeren Konzentration ( $10^{-6}$  M) sind hier neben ähnlichen Veränderungen der Mitochondrien bereits deutliche Verbreiterungserscheinungen der Zisternen des rER nachweisbar.

##### Nach 3 h bis 6 h

Die Vakuolisierung im Zytoplasma der Fibroblasten wird jetzt stärker. Ebenfalls beobachtete Veränderungen an den GOLGI-Apparaten entsprechen den Befunden bei der niedrigeren Konzentration von  $10^{-6}$  M. Zahlreiche Zellen beinhalten große Kerne mit zahlreichen Kernmembraneinstülpungen, d.h. es hat sich eine Verschiebung des Kern-Plasma-Verhältnisses zugunsten des Kernes eingestellt (Abb. 28,29). Im Zytoplasma treten die morphologisch in der oben beschriebenen Weise veränderten Mitochondrien verstärkt hervor.

##### Nach 9 h

Sehr eindrucksvoll ist der Ausprägungsgrad des rER zu diesem Zeitpunkt, die Breite der einzelnen Zisternen gegenüber den vorhergegangenen Zeitpunkten scheint jedoch bereits wieder abzunehmen. auch die Zahl der Mitochondrien nimmt jetzt zu. Am

bemerkenswertesten ist jedoch die kreisförmige Anordnung der Zellorganellen um den Kern (Abb. 30, 31). In Kernnähe sind zahlreiche, paketartig angeordnete GOLGI-Zisternen zu beobachten, bei denen häufig eine Erweiterung der Zisternen sichtbar wird. In einigen Zellen kommt es durch die Einstülpungen der Kernmembran zu bizarren Gestalten der Kerne (Abb. 33), in denen im Gegensatz zu den anderen behandelten Zellen an der Innenseite der Kernmembran zahlreiche größere Chromatinauflagerungen (Heterochromatin) zu erkennen sind.

#### Nach 12 h bis 72 h

Die Veränderungen innerhalb dieses Zeitraums entsprechen den Befunden zu diesen Zeitpunkten nach Applikation der niedrigeren Konzentration ( $10^{-6}$  M). Zum Zeitpunkt von 12 h lassen sich auch in einigen Zellen prophaseartige Kernveränderungen entsprechend den lichtmikroskopischen Befunden nachweisen. Später sind zahlreiche nekrotische Zellen und verschiedene irreversible Zellschädigungen nachzuweisen. Das rER wird wieder weniger, teilweise verschwindet es ganz.

Die lichtmikroskopisch zu diesem Zeitpunkt beschriebenen Riesenzellen finden sich auch bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung (Abb. 32). Dieser Zelltyp scheint arm an zytoplasmatischen Zellorganellen zu sein, nur vereinzelt sind Mitochondrien und Reste des rER zu erkennen. Die großen Kerne beherrschen das Bild. An der Kernmembranninnenseite sind Chromatinauflagerungen zu erkennen, die Kernmembran zeigt jedoch kaum Einstülpungen.

#### 4.4.3. Beschreibung der mit TDC behandelten Zellen

Aufgrund der im wesentlichen übereinstimmenden Befunde mit den schon beschriebenen morphologischen Veränderungen nach VDC-Behandlung soll hier im folgenden nur auf die Unterschiede in diesen Befunden eingegangen werden.

Unterschiede der morphologischen Veränderungen nach Applikation der hohen und der niedrigeren Konzentration ( $5 \times 10^{-5}$  bzw.  $5 \times 10^{-4}$  M) sind nur im zeitlichen Ablauf zu beobachten: Bei der höheren Konzentration ( $5 \times 10^{-4}$  M) treten die beschriebenen Veränderungen in der Regel zwischen 3 h und 6 h früher ein. Teilweise sind bei dieser Konzentration auch stärkere Ausprägungen der morphologischen Veränderungen zu finden. Wesentliche Unterschiede in der Art und Weise der Veränderungen können nicht beobachtet werden.

#### Nach 0 h

Außer der hier auch vorhandenen Veränderung an den Mitochondrien (Beschreibung siehe Kap. 4.4.2.1.) fällt hier auf, daß die Vakuolenbildung bei einer Konzentration von  $5 \times 10^{-5}$  M) geringer, als bei der vergleichbaren VDC-Konzentration ist. Bei der höheren Konzentration ( $5 \times 10^{-4}$  M) nimmt die Bildung von Vakuolen jedoch eindeutig zu, es gibt jetzt keinen Unterschied zu der vergleichbaren VDC-Konzentration mehr.

#### Nach 3 h bis 6 h

Hier finden sich auch die schon beim VDC beschriebenen Veränderungen des rER (siehe Abb.34), sowie der Mitochondrien und der GOLGI-Apparate. Die Erweiterung der Zisternen des rER ist jedoch offensichtlich nicht so ausgeprägt, wie sie bei der Untersuchung des VDC in Erscheinung tritt. Auch der Kern ist hell und transparent und weist wenig oder keine Chromatinklumpungen auf.

#### Nach 9 h

Innerhalb von 9 h nach Expositionsende entwickeln sich im Gegensatz zum VDC bei beiden Konzentrationsschritten zu einer unregelmäßigen Gestalt des Kernes, zum anderen Kernmembraneinstülpungen (Abb.35). Darüberhinaus driften offen-

sichtlich die Nukleolusbestandteile auseinander (siehe auch Abb.37). Beim VDC werden diese Veränderungen nur bei der höheren Konzentration nachgewiesen.

#### Nach 12 h bis 72 h

In den folgenden Zeiträumen kommt es zunächst zu einer starken Erweiterung der Zisternen des rER (Abb.36). Dies ist besonders 48 h nach Beendigung der TDC-Exposition zu beobachten, während danach - entsprechend den Befunden beim VDC - die Vermehrung des rER wieder deutlich abnimmt und bei 72 h kaum noch festzustellen ist (Abb.37). Auch die Kern-Plasma-Relation verändert sich zugunsten des Kernes.

Zum Zeitpunkt von 12 h lassen sich auch gelegentlich Prophasezellen finden, entsprechend den lichtmikroskopischen Befunden. Neben den ebenfalls schon lichtmikroskopisch nachgewiesenen mehrkernigen Zellen (Abb.38) finden sich auch hier wieder zahlreiche irreversibel geschädigte Fibroblasten (Abb.39).

#### 4.4.4. Beschreibung der mit DDP behandelten Zellen

Auch hier soll im folgenden - entsprechend dem Vorgehen bei der Beschreibung der mit TDC behandelten Fibroblasten - nur auf die Unterschiede der morphologischen Veränderungen eingegangen werden, da auch hier weitgehend die gleichen Befunde vorliegen, wie nach Applikation der Metallocene.

#### Nach 0 h bis 3 h

Neben den schon nach Gabe der Metallocene beschriebenen Veränderungen an den Mitochondrien, dem rER und dem GOLGI-Apparat, sowie der Ausbildung von Vakuolen, kommen hier 3 h nach Applikation von DDP Veränderungen im Kern hinzu, die beim TDC und VDC nicht beobachtet werden können: An der Kernmembraninnenseite kommt es zu einer verstärkten Ausprägung von plaqueartigen, elektronendichten Heterochromatin-Auflagerungen (Abb.40).

Das Auftreten dieser Chromatinverdichtungen kann nach Behandlung von Fibroblasten mit Metalloenen nur vereinzelt und immer nur in Verbindung mit auffälligen Kernmembranveränderungen beobachtet werden. Dies ist bei der hier durchgeführten Untersuchung der deutlichste Unterschied zwischen DDP und den Metalloenen.

#### Nach 6 h bis 24 h

Jetzt stehen wie bei den Metalloenen die verstärkte Ausprägung des GOLGI-Apparates, die Verbreiterung und Vermehrung der Zisternen des rER und die Quellung und Deformation der Mitochondrien im Vordergrund (Abb.41,42,43).

Die Kernmembran beginnt sich nun ebenfalls einzustülpen, der bei der unbehandelten Zelle gleichmäßig oval gestaltete Kern wird unregelmäßig (Abb. 42). Die auffälligen Chromatinauflagerungen sind in diesen Beobachtungszeiträumen ebenfalls nachzuweisen und haben sich gegenüber den vorherigen Zeitpunkten verstärkt.

Zwischen 9 h und 24 h nach erfolgter Behandlung kommt es bei der höheren DDP-Konzentration ( $5 \times 10^{-6}$  M) im Gegensatz zu der niedrigeren Konzentration ( $5 \times 10^{-7}$  M) zu einer Segregation der Nukleolusbestandteile. Das Auseinanderdriften der Kernkörperchenbestandteile ist hier viel stärker als bei den Metalloenen und auch ausgeprägter als bei der niedrigeren DDP-Konzentration (Abb.44).

#### Nach 48 h bis 72 h

Das Kern-Plasma-Verhältnis beginnt sich zugunsten des Kerns zu verschieben. Es entstehen Riesenzellen, deren gesamtes Zellvolumen fast völlig vom Kern ausgefüllt wird (Abb. 46,47), in einigen Zellen finden sich neben den schon beschriebenen Kernmembraneinstülpungen Anzeichen für eine unvollständige Kernteilung (Abb.47). Das Ausmaß der Chromatinklumpungen wird nun

wieder schwächer, viele Zellen zeigen eine ähnlich transparente Veränderung des Zytoplasmas, wie sie für die Befunde beim TDC und VDC typisch sind. Ein Unterschied zu den Metalloenen besteht auch in der Ausprägung des rER. Während es sich beim VDC und TDC in den späteren Beobachtungszeiträumen fast völlig zurückbildet, bleibt es beim DDP bis zum Untersuchungszeitpunkt von 72 h nach Behandlungsende nachweisbar.

Abschließend soll noch einmal darauf hingewiesen werden, daß neben den bei 9 h bis 24 h auftretenden Nukleolusveränderungen (Abb.44) Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Konzentrationsschritten ( $5 \times 10^{-7}$  M und  $5 \times 10^{-6}$  M) lediglich im zeitlichen Ablauf der einzelnen Veränderungen zu finden sind. Bei der höheren Konzentration treten die Veränderungen 3 h bis 6 h früher auf als bei der niedrigeren Konzentration.

Abb. 24 - 27: Embryonale Fibroblasten nach  $10^{-6}$  M VDC-  
Behandlung.

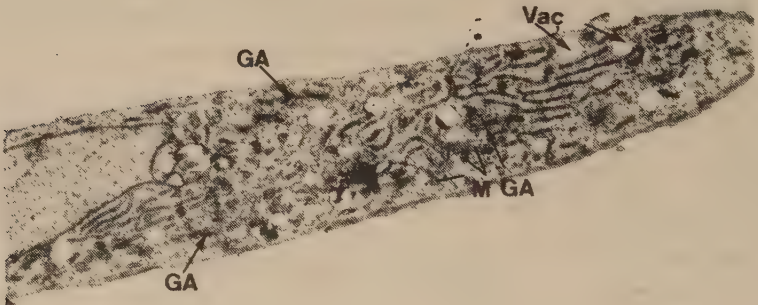


Abb. 24: Embryonale Fibroblasten 6 h nach einmaliger VDC-  
Behandlung ( $10^{-6}$  M). Zunahme des rER und der Mitochondrien  
(M), zahlreiche Vakuolen (Vac) und vermehrtes Auftreten von  
GOLGI-Zisternen (GA).

Vergr. 22 000 x

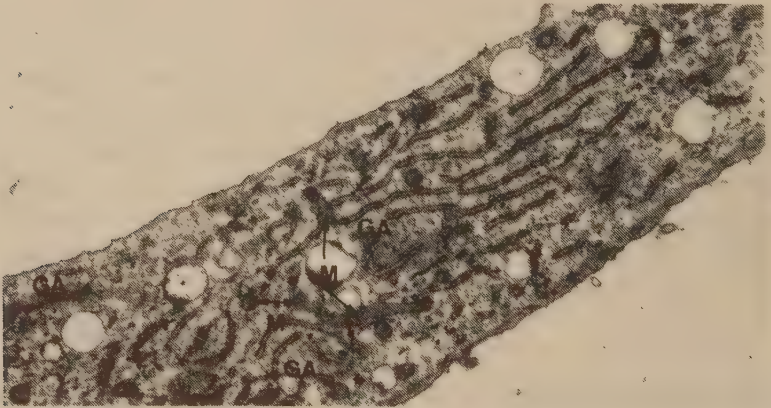


Abb. 25: Ausschnitt aus Abb.24, Vergrößerung der Mitochon-  
drien (M) und prominente GOLGI-Apparate (GA).

Vergr. 33 000 x

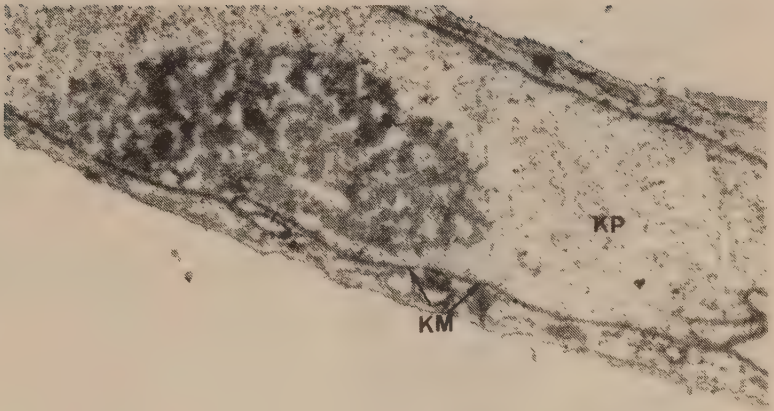


Abb. 26: Embryonaler Fibroblast 6 h nach VDC-Behandlung ( $10^{-6}$  M). Deutlich elektronenoptisch transparentes Karyoplasma (KP), keine Chromatinauflagerungen an der Kernmembraninnenseite, beginnende Segregation der Nukleolusbestandteile (KM = Kernmembran).

Vergr. 22 000 x

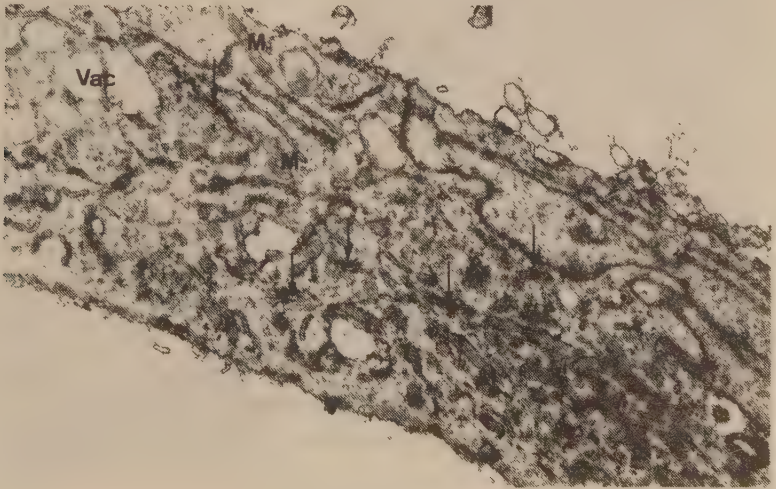


Abb. 27: Embryonaler Fibroblast 9 h nach Behandlung ( $10^{-6}$  M).  
Text siehe nächste Seite.

Text zu Abb. 27 (vorhergehende Seite):

An diesem Fibroblasten zeigt sich eine Zunahme von Vakuolen (Vac), eine Vermehrung der unregelmäßig geformten und in ihrem Inneren homogen erscheinenden Mitochondrien (M) und von GOLGI-Apparaten (Pfeile).

Vergr. 24 000 x

Abb. 28 - 33: Embryonale Fibroblasten nach  $10^{-5}$  M VDC-  
Behandlung.

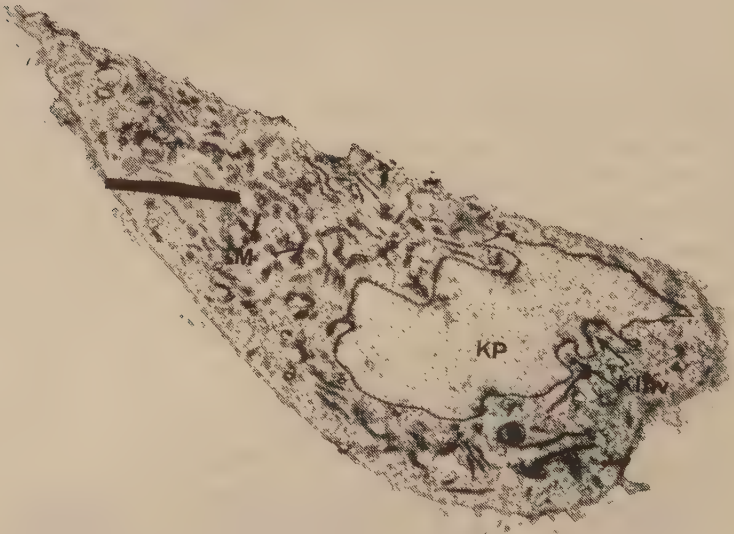


Abb. 28: Embryonaler Fibroblast 3 h nach VDC-Behandlung ( $10^{-5}$  M). Zahlreiche morphologisch veränderte Mitochondrien (M), transparentes Karyoplasma (KP), starke Fältelung der Kernmembran und Ausbildung von Kerninvaginationen (KInv).

Vergr. 6 700 x

Abb. 29:

Fibroblast 6 h nach VDC-  
Behandlung ( $10^{-5}$  M), Ver-  
schiebung der Kern-Plasma-  
Relation; großer, trans-  
parenter Kern mit zahl-  
reichen Kernmembraninvasi-  
nationen.

Vergr. 10 600 x

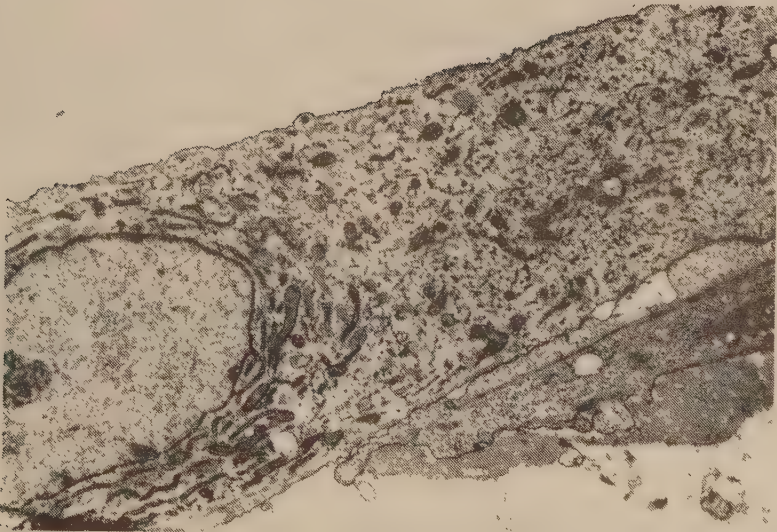
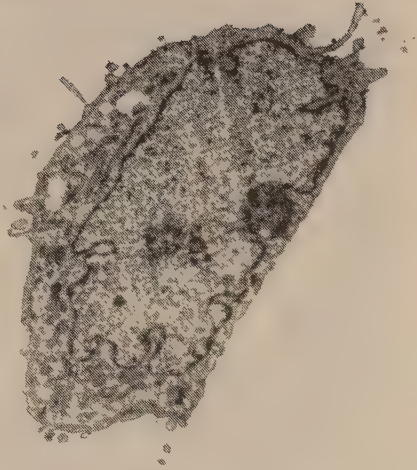


Abb. 30: Embryonaler Fibroblast 9 h nach VDC-Behandlung  
( $10^{-5}$  M). Erläuterungen siehe nächste Seite.

Vergr. 10 000 x

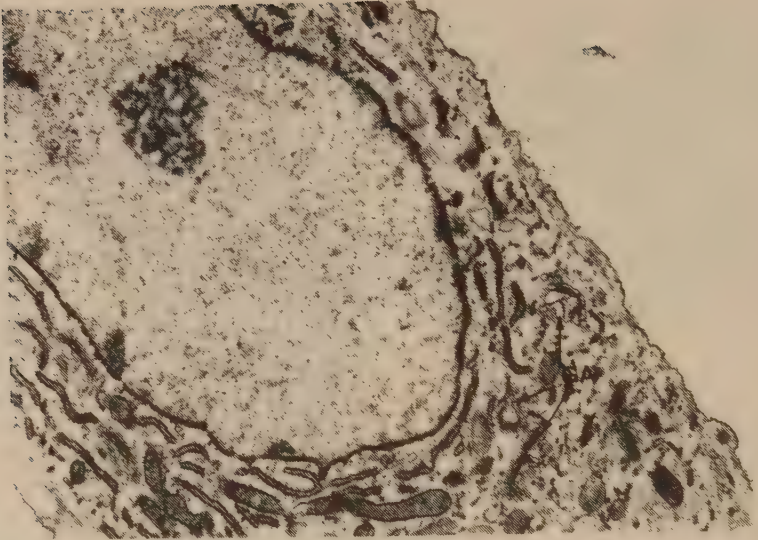


Abb. 31: Ausschnitt aus Abb. 30. Vergr. 17 700 x

Text zu Abb. 30, 31: Auffällig ist hier vor allem die ringförmige Anordnung von Zellorganellen um den Kern, die verstärkte Ausprägung des GOLGI-Apparates mit extremer Erweiterung der Zisternen (GA). Helles, transparentes Karyoplasma, geringe Chromatinauflagerungen an der Kernmembraninnenseite.

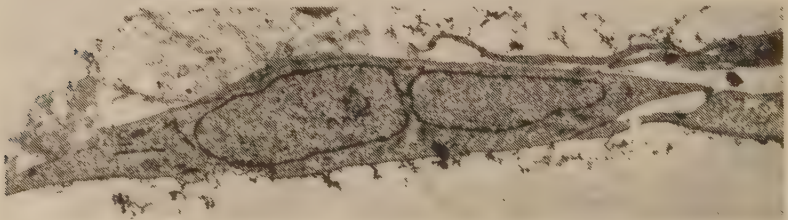


Abb. 32: Embryonaler Fibroblast, 72 h nach VDC-Behandlung ( $10^{-5}$  M), zweikernige Riesenzelle, nur noch sehr schwache Ausprägung des rER.

Vergr. 5 800 x

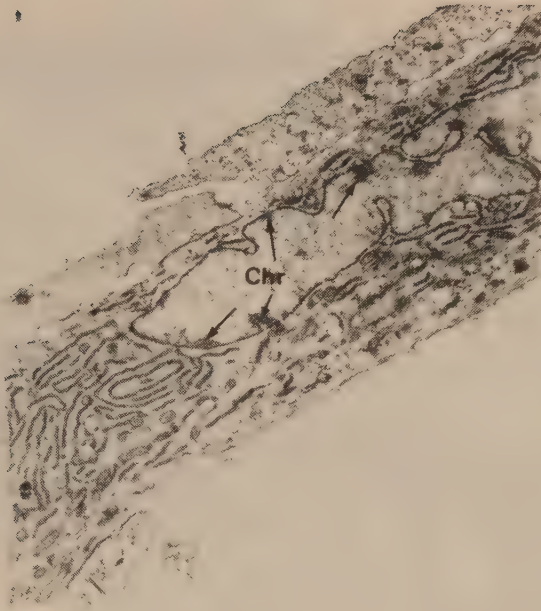


Abb. 33: Embryonaler Fibroblast 9 h nach VDC-Behandlung ( $10^{-5}$  M). Bizarre Kerngestalt mit starker Invagination der Kernmembran und Heterochromatinauflagerungen an der Innenseite (Chr), stark ausgeprägtes rER.

Vergr. 7 100 x

Abb. 34 - 39: Embryonale Fibroblasten nach  $5 \times 10^{-5}$  M und  $5 \times 10^{-4}$  M TDC-Behandlung.

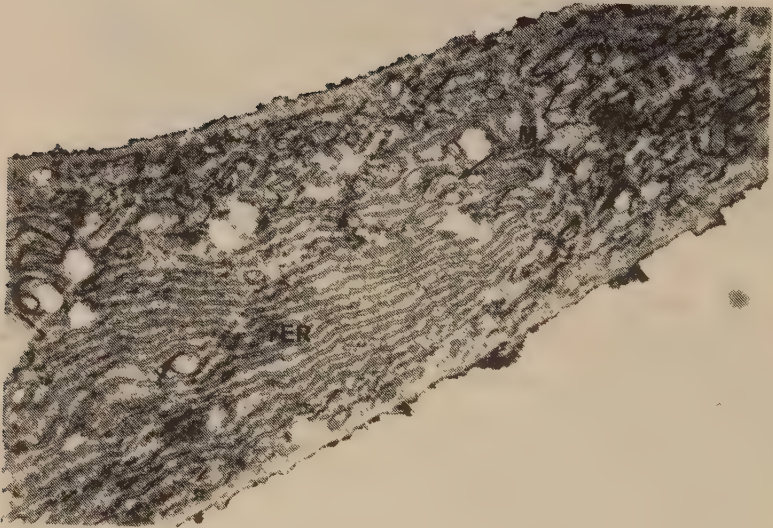


Abb. 34: Embryonaler Fibroblast 12 h nach einmaliger TDC-Behandlung ( $5 \times 10^{-4}$  M). Stark ausgeprägtes rER, Vakuolen und degenerativ veränderte Mitochondrien mit wenigen cristae mitochondrales und heller, teilweise annähernd homogener Grundstruktur (M).

Vergr. 18 000 x

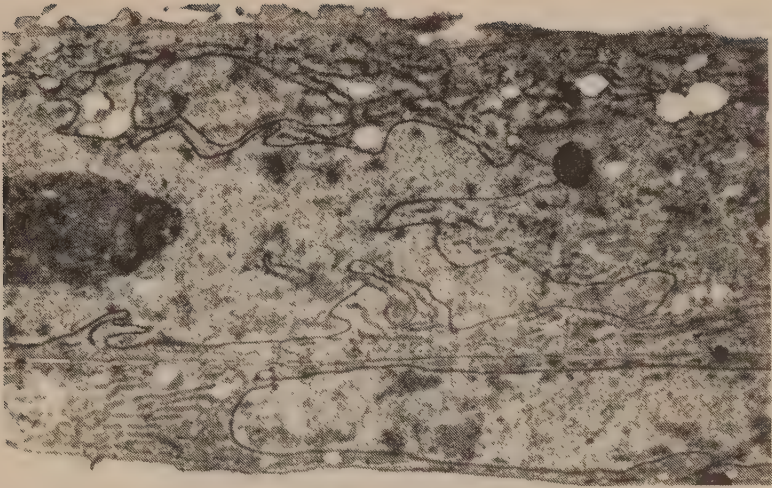


Abb. 35: Fibroblast 9 h nach TDC-Behandlung ( $5 \times 10^{-5}$  M), starke Kernmembraneinstülpungen und ausgeprägte Kernsegmentierung.

Vergr. 9 700 x



Abb. 36: Embryonaler Fibroblast 48 h nach TDC-Behandlung ( $5 \times 10^{-5}$  M), Erweiterung der Zisternen des rER, Auffüllung mit homogenem Material.

Vergr. 13 200 x

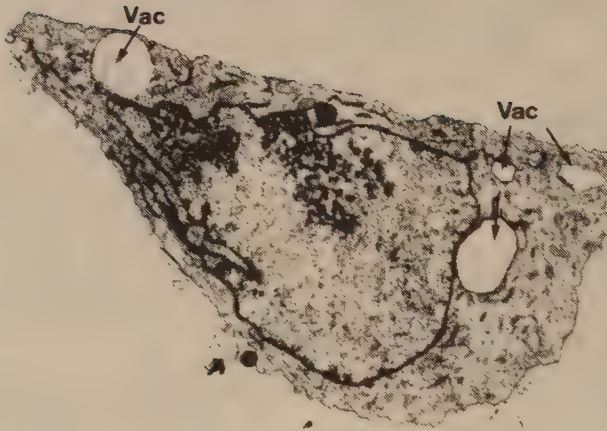
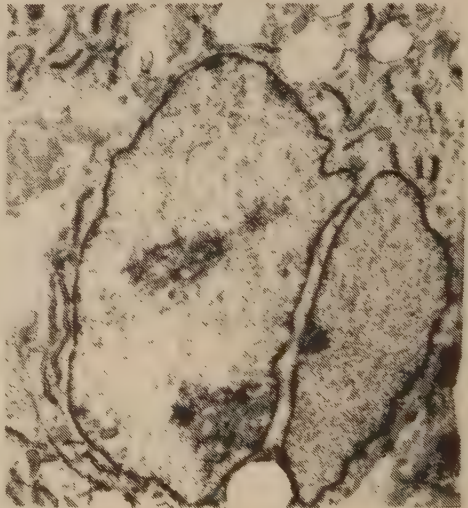


Abb. 37: Embryonaler Fibroblast 48 h nach TDC-Behandlung ( $5 \times 10^{-5}$  M), Verschiebung der Kern-Plasma-Relation, großer transparenter Kern, Segregation und Degeneration des Nukleolus, nur noch gering ausgeprägtes rER, große Vakuolen (Vac).  
Vergr. 8 000 x

Abb. 38:  
Fibroblast 48 h nach TDC-Behandlung ( $5 \times 10^{-5}$  M), mehrkernige Riesenzelle, keine Heterochromatinklumpungen im Karyoplasma und an der Kernmembrannnenseite.  
Vergr. 12 000 x



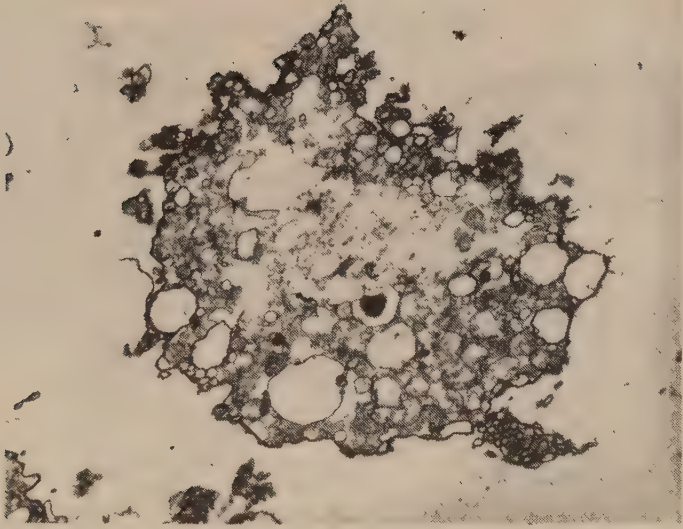


Abb. 39: Embryonaler Fibroblast, 48 h nach TDC-Behandlung ( $5 \times 10^{-5}$  M), irreversible Zellschädigung, zahlreiche Vakuolen, degenerative zytoplasmatische Organellen, kein Kern mehr nachzuweisen.

Vergr. 13 200 x

Abb. 40 - 47 Embryonale Fibroblasten nach  $5 \times 10^{-7}$  M und  $5 \times 10^{-6}$  M DDP-Behandlung

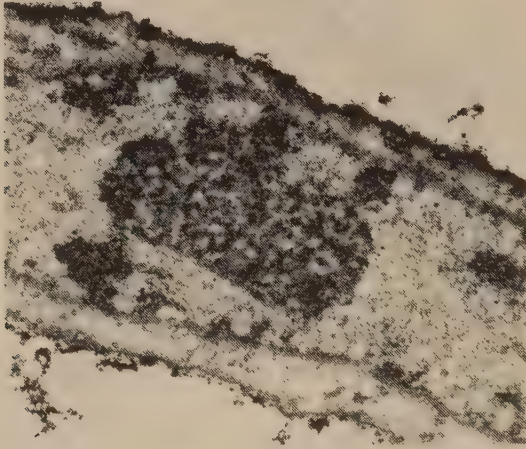


Abb. 40: Embryonaler Fibroblast 3 h nach DDP-Behandlung ( $5 \times 10^{-7}$  M), Heterochromatinauflagerungen an der Kernmembrannenseite. Vergr. 26 800 x

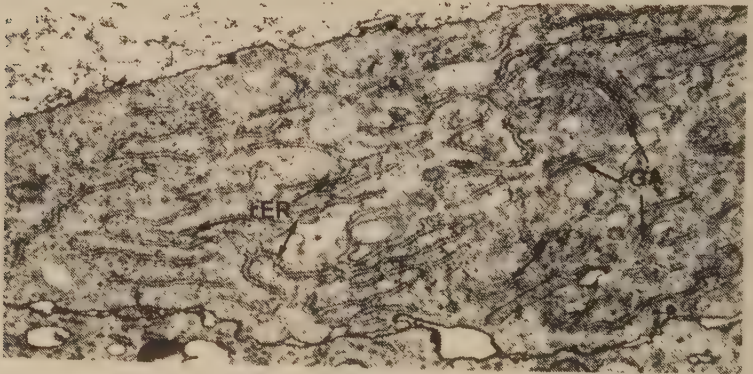


Abb. 41: Embryonale Fibroblasten 24 h nach DDP-Behandlung ( $5 \times 10^{-7}$  M), stark ausgeprägte GOLGI-Apparate (GA), Verstärkung des rER, Vergr. 18 300 x

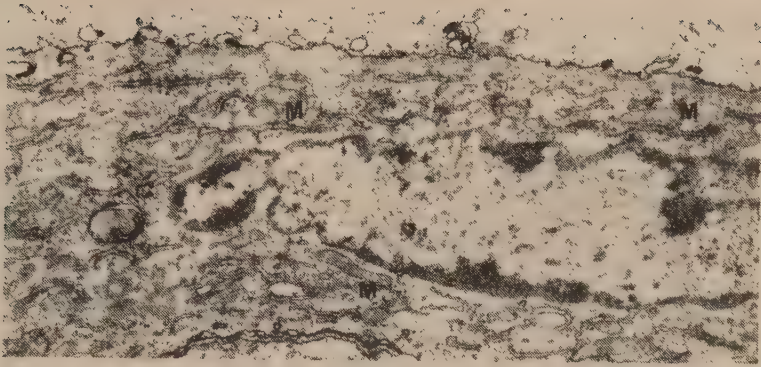


Abb. 42: Embryonaler Fibroblast 24 h nach DDP-Behandlung ( $5 \times 10^{-7}$  M), Quellung der Mitochondrien (M), Chromatinauflagerungen an der Kernmembraninnenseite, Kernmembraneinstülpungen. Vergr. 19 200 x

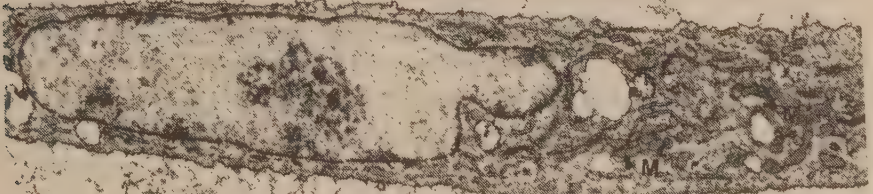


Abb. 43: Embryonaler Fibroblast 24 h nach DDP-Behandlung ( $5 \times 10^{-7}$  M). Hier deutlich vergrößerte und zahlenmäßig vermehrte Mitochondrien (M), Segregation der Nukleolusbestandteile. Vergr. 24 500 x

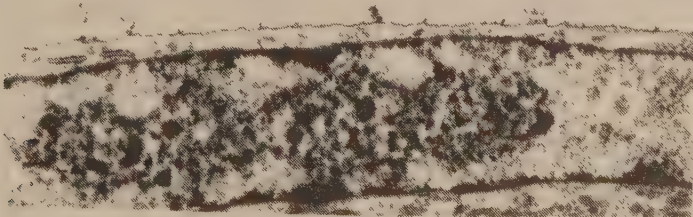


Abb. 44: Embryonaler Fibroblast 9 h nach DDP-Behandlung ( $5 \times 10^{-6}$  M). Erläuterung siehe nächste Seite.

Text zu Abb. 44: Hier wird das Auseinanderweichen der Nukleolusbestandteile besonders deutlich (Beginnende Segregation)  
Vergr. 16 000 x

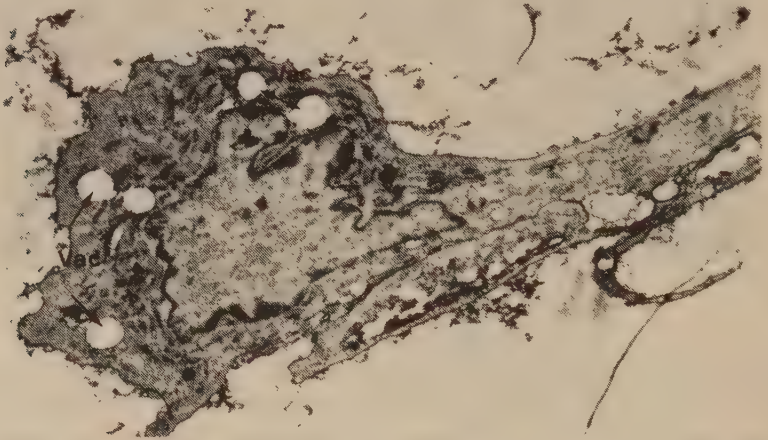


Abb. 46: Embryonaler Fibroblast 48 h nach DDP-Behandlung ( $5 \times 10^{-7}$  M), Riesenzelle mit stark vergrößertem Kern, zahlreiche Kernmembraneinstülpungen und Heterochromatinauflagerungen an der Kernmembraninnenseite, Vakuolen (Vac),  
Vergr. 6 000 x

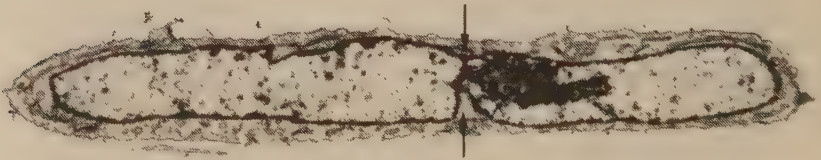


Abb. 47: Embryonaler Fibroblast 48 h nach DDP-Behandlung ( $5 \times 10^{-7}$  M), Auch hier extreme Kernvergrößerung, Anzeichen für inkomplette Kernteilung (↑)  
Vergr. 6 400 x

## 5. Diskussion

### 5.1. Diskussion des Wachstumsverhaltens und der Zelltoxizität

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals das Wachstumsverhalten normal strukturierter menschlicher Zellen unter Einwirkung der Metalloccen-dihalogene TDC und VDC untersucht. Als Referenzsubstanz diente hierbei das edelmetallhaltige DDP, das in der Klinik bereits eingesetzt wird. Ziel dieser Arbeit war es auch herauszufinden, ob eine spezifische Wirkung der Metalloccendihalogene gegenüber malignen Zellen nachzuweisen war. Wenn dies der Fall gewesen wäre, hätte sich bei der Substanztestung gegenüber den hier verwendeten embryonalen Fibroblasten eine wesentlich geringere wachstumshemmende Aktivität nachweisen lassen, als gegenüber malignen Zellen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch belegt werden, daß die Empfindlichkeit dieser nicht-malignen Zellen gegenüber den Metalloccenen sehr ähnlich den Befunden ist, die KÖPF-MAIER<sup>13,14,22</sup> an EAT-Zellen erhob. Einige Abweichungen ergaben sich dennoch, die vor allem in der Verwendung einer anderen Kulturtechnik der Fibroblasten im Gegensatz zu den EAT-Zellen begründet waren. Eine Spezifität von DDP, TDC und VDC gegenüber malignen Zellen konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht bewiesen werden.

Wenig Unterschiede hingegen ergaben sich bei der Betrachtung der Abhängigkeit der zellwachstumshemmenden Wirkung von der Substratkonzentration, der sog. Dosis-Wirkungs-Beziehung. Die gefundenen Hemmkonzentrationen entsprachen bei allen drei getesteten Substanzen den gegenüber EAT-Zellen erforderlichen Konzentrationen. Eine absolute Identität der Hemmkonzentrationen war natürlich nicht vorhanden, die in dieser Arbeit ermittelten Werte näherten sich jedoch weitgehend an die von KÖPF-MAIER<sup>22</sup> gefundenen Werte an, Augenfällig ist hierbei wieder die wesentlich stärkere Wirkung von VDC im Vergleich zum TDC:

Bereits bei einer Konzentration von  $10^{-6}$  M kündigte sich nach Behandlung mit VDC eine Wachstumshemmung an, bei  $10^{-5}$  M war diese bereits deutlich nachweisbar. Dies entsprach einer 50- bis 100mal niedrigeren Konzentration des VDC gegenüber TDC zur Erzielung einer vergleichbaren Wachstumshemmung. Damit hatten die beiden Metallocendichloride eindeutig eine unterschiedliche Wirkintensität im in-vitro-Versuch. Ob sich jedoch auch Unterschiede im Wirkungsmechanismus aus diesen Ergebnissen ableiten lassen, konnte aus diesen Befunden nicht geschlossen werden.

Bei der Untersuchung der wachstumshemmenden Eigenschaften des DDP war festzustellen, daß die optimale Hemmkonzentration für das Wachstum der Fibroblasten bei etwa  $5 \times 10^{-6}$  M lag, und daß damit das DDP bezüglich seiner Wirkintensität den wachstumshemmenden Eigenschaften des VDC näher stand, als denen des TDC.

Bei Applikation der jeweils höchsten Substanzkonzentrationen (TDC:  $5 \times 10^{-3}$  M; VDC:  $10^{-4}$  M; DDP:  $10^{-5}$  M) zeigte es sich, daß innerhalb des Beobachtungszeitraums von 72 h eine Abnahme der Zellzahl auffiel, wie dies in den Abbildungen 3 bis 5 augenfällig wird. Als Ursache hierfür könnte ein stärkerer direkt-zytotoxischer Effekt der getesteten Substanzen auf embryonale Fibroblasten im Vergleich zu EAT-Zellen verantwortlich gemacht werden. Dadurch könnte es zu einer größeren Anzahl völlig zerstörter Zellen gekommen sein, was wiederum zu einem Absinken der Zellzahl innerhalb des Beobachtungszeitraums von 72 h führte.

Als Ursache für die Abnahme der Zellzahl bei diesen hohen Konzentrationen aller drei Substanzen hätte auch eine Verminderung des Haftvermögens von sehr stark geschädigten Zellen verantwortlich gemacht werden können. In der Endphase der Zellnekrose kam es dadurch möglicherweise zu einem Ablösen von Zellen von der Unterlage der Kulturflaschen, was zu dem Absinken der auf dem Kulturflaschenboden bestimmten Zellzahl

bei den höchsten getesteten Konzentrationen führte.

Bemerkenswert war auch der Sachverhalt, daß bereits bei den niedrigsten Konzentrationen aller drei Substanzen (Werte siehe Tab. I) zahlreiche geschädigte Zellen vorhanden waren. Es waren hier innerhalb des gesamten Beobachtungszeitraums zwischen 20% und 40% avitale Fibroblasten nachzuweisen. Andererseits unterschieden sich die Wachstumskurven der mit diesen niedrigen Konzentrationen behandelten Zellen noch kaum von denen der unbehandelten Kontrollpopulation. Hätte sich die im Avitalitätsindex dargestellte starke Zellschädigung im Wachstumsverhalten wiedergespiegelt, wäre ein Absinken der Zellzahl der behandelten Zellen gegenüber der unbehandelten Kontrollpopulation festzustellen gewesen. Dies war nicht der Fall. Hier mußten offensichtlich "reparative" Mechanismen eingesetzt haben, die über eine erhöhte Mitoseaktivität nach Beendigung der Zytostatikabehandlung oder anderer, unbekannter Prozesse, die die Zahl der nekrotischen Zellen kompensierten, eine entscheidende Rolle spielen.

## 5.2. Diskussion der morphologischen Veränderungen im licht- und elektronenmikroskopischen Bereich

### 5.2.1. Überlegungen zum Mitoseverhalten

Im Rahmen dieser Arbeit wurde keine quantitative Analyse des Mitoseverhaltens durchgeführt. Trotzdem waren bei der Auswertung insbesondere der lichtmikroskopischen Befunde einige Besonderheiten festzustellen.

Es fiel in der vorliegenden Studie auf, daß sich sehr selten späte Mitoseformen, wie Meta-, Ana-, und Telophasen, oder Mitoseanomalien fanden, wie sie von KÖPF-MAIER<sup>24,36</sup> am EAT-System nachgewiesen wurden. Diese Beobachtung könnte darin begründet liegen, daß sich die Fibroblasten während der Mitose "abkugelten" und dadurch nur noch eine sehr geringe Haftung an

der Unterlage der Kulturflaschen besaßen. (SCHARLACH & ZIMMERMANN<sup>37</sup>). Auf der anderen Seite fanden sich insbesondere 12 h nach Behandlungsende zahlreiche Prophasezellen bei allen drei getesteten Substanzen, also frühe Formen der Mitose. Dies erhärtete den Verdacht, daß die späteren Mitoseformen durch das präparative Vorgehen, bei dem ja das Nährmedium und damit darin schwimmende Fibroblasten verworfen wurde, verloren ging.

Die zahlreichen Prophasen 12 h nach Behandlung deuteten auf eine Blockierung der Mitoseaktivität mit nachfolgender Verstärkung der Mitose hin. Diese frühen Mitoseformen traten bei niedrigen und mittleren Konzentrationen (Werte siehe Tab. I) gleichermaßen auf. Später nahmen die Prophasezellen wieder ab, das Mitoseverhalten schien sich wieder zu normalisieren .

### 5.2.2. Zytoplasmatische Veränderungen

#### 5.2.2.1 Veränderungen an den Mitochondrien

Die morphologischen Veränderungen der Mitochondrien waren sehr augenfällig und standen im Vordergrund der frühen Beobachtungszeitpunkte. Das relativ regelmäßig geformte Mitochondrium der unbehandelten Zelle vergrößerte sich kurz nach Beendigung der Zytostatikabehandlung, seine Gestalt wurde unregelmäßig, und es schien aufzuquellen. Die mitochondriale Ultrastruktur begann sich aufzulockern, unter gleichzeitiger Abnahme der cristae mitochondrales. Später folgte dann eine zahlenmäßige Zunahme der Mitochondrien, die bei allen drei getesteten Substanzen gleichmäßig, aber konzentrationsabhängig war. Das bedeutete, daß die Zahl der Mitochondrien nach Applikation mittlerer Konzentrationen (Werte siehe Tab. I) höher war, als nach Behandlung mit niedrigen Konzentrationen.

Die in der vorliegenden Studie beobachteten ultrastrukturellen Veränderungen des einzelnen Mitochondriums wurden für den Fall

des DDP schon von anderen Autoren beschrieben (SODHI<sup>38,39,41</sup> AGGARWAL<sup>1,2</sup>), sind aber schwierig zu interpretieren. Die Autoren waren der Meinung, daß es sich hier um direktzytotoxische Effekte handelte, die zu degenerativen Veränderungen der Mitochondrien führten. Die Quellung könnte durch eine verstärkte Wassereinlagerung erfolgt sein, die Veränderung an den cristae als Folge eines gestörten Stoffwechsels interpretiert werden. Während diese qualitativen Veränderungen von KÖPF-MAIER<sup>24,25</sup> an EAT-Zellen nicht beschrieben wurden, beobachtete sie eine zahlenmäßige Zunahme der Mitochondrien in ähnlicher Weise, wie sie in der vorliegenden Arbeit auch gefunden wurde. Sie interpretierte dies als Ausdruck einer Intensivierung von bestimmten Stoffwechselschritten ("unbalanced cell growth") in Folge der Zytostatikabehandlung durch die Metallocendihalogenide.

Als Ursache der mitochondrialen Veränderung könnte auch ein Angriff der Zytostatika an der mitochondrialen DNA in Betracht kommen. Diese Nukleinsäure, deren genaue Bedeutung nicht bekannt ist, dürfte durch die Zytostatika in gleicher Weise verändert werden, wie dies für die DNA des Kerns vermutet wurde. Das morphologische Substrat könnte dann die oben aufgeführte Veränderung der Mitochondrien sein.

Die zahlenmäßige Zunahme der Mitochondrien hingegen könnte als reparativer Mechanismus der Zellen gedeutet werden, die Schädigung der einzelnen Mitochondrien durch erhöhte Quantität ausgleichen.

Am Schluß dieses Kapitels ist festzuhalten, daß die Veränderungen an den Mitochondrien deutlich in Erscheinung traten und stereotyp bei allen drei getesteten Substanzen abliefen; die Ursache der Veränderungen war aufgrund der vorliegenden Befunde nicht eindeutig abzuklären.

#### 5.2.2.2. Veränderungen am GOLGI-System

Die Veränderungen am GOLGI-Apparat bestanden neben einer Verbreiterung der Zisternen und einer verstärkten Vesikelbildung vor allem in einer zahlenmäßigen Zunahme der einzelnen GOLGI-Komplexe. Dies geschah bei allen drei getesteten Substanzen gleichmäßig in den Beobachtungszeiträumen von 3 h bis 9 h.

Als Ursache dieser Veränderung dürfte eine Aktivierung des Proteinstoffwechsels anzunehmen sein, da das GOLGI-System bei der Proteinsynthese eine Schlüsselrolle spielt. Im Gegensatz zu den Mitochondrien bestand zu keinem Zeitpunkt ein Anhalt für degenerative Veränderungen. Alles deutete darauf hin, daß es hier zu einer verstärkten Sekretionsleistung der Zellen kam, der eine Steigerung des Proteinstoffwechsels zugrunde liegen dürfte.

#### 5.2.2.3 Veränderungen am rauhen endoplasmatischen Retikulum (rER)

Beim rER kam es 3 h bis 6 h nach Substanzentfernung zu einer Erweiterung der Zisternen, die häufig mit einer homogenen Masse angefüllt erschienen. Die Ausprägung dieses Phänomens war bei den einzelnen Substanzen unterschiedlich: So fanden sich nach TDC-Behandlung extreme Verbreiterungen der Zisternen (s. Abb. 36) die entweder auf eine gesteigerte Sekretproduktion oder auf einen Sekretstau hindeuteten. Nach DDP-Behandlung war die Verbreiterung der Zisternen hingegen nicht so ausgeprägt, nach VDC-Behandlung fanden sich Befunde, die denen, der mit TDC behandelten Zellen entsprachen.

Nach dieser Veränderung kam es zu einer Zunahme der Zisternen, so daß teilweise das gesamte Zytoplasma mit rER ausgefüllt war. Lichtmikroskopisch ließ sich dies als Ausbildung eines zarten Netzwerkes im Zytoplasma erahnen. Der Ausprägungsgrad nahm aber bei den mit TDC und VDC behandelten Zellen in den

späteren Beobachtungszeiträumen wieder ab, ja teilweise verschwand das rER ganz. Bei den mit DDP behandelten Zellen blieb das rER bis zum Ende des Beobachtungszeitraums von 72 h erhalten.

Die Zunahme des rER, die von KÖPF-MAIER<sup>25</sup> an EAT-Zellen beschrieben wurde, ist auch im Zusammenhang mit einer intensivierten Proteinbiosynthese zu sehen. Aber auch eine Sekretionshemmung des vom rER gebildeten Substrats, die ihre Ursache möglicherweise in Membrandefekten des rER haben könnte, muß in Erwägung gezogen werden. Die spätere Abnahme des rER beim VDC und TDC, die erstaunlicherweise an mit DDP behandelten Zellen nicht zu beobachten war, ist schwierig zu interpretieren. Wahrscheinlich handelt es sich hier um Unterschiede in Art oder Ausmaß der Beeinflussung des Proteinstoffwechsels durch die Metalloendihalogenide einerseits und DDP andererseits. Durch die offensichtliche Stimulation des Proteinstoffwechsels durch VDC und TDC könnte es möglicherweise in den späteren Beobachtungszeiträumen zu einer Erschöpfung der vorhandenen Substrate kommen. Ein Rückgang des rER wäre so verständlich, es käme zu einer "Zellkachexie" in den späten Beobachtungszeiträumen. Sollte die Stimulation nach DDP-Behandlung geringer gewesen sein, wäre auch eine Erschöpfung nicht so rasch möglich gewesen.

AGGARWAL<sup>1,2</sup> und SODHI<sup>38,39,41</sup> beschrieben bei ihren Untersuchungen ebenfalls eine Abnahme des rER. Sie interpretierten diese Wandlung - wie fast alle anderen zytoplasmatischen Veränderungen lediglich als Ausdruck einer Degeneration des gesamten Zellstoffwechsels. Die Befunde der frühen Beobachtungszeitpunkte (3 h bis 24 h) in der vorliegenden Studie sprechen aber gegen diese Aussage.

### 5.2.3. Veränderungen am Kern

Im Gegensatz zu den von KÖPF-MAIER<sup>25</sup> am EAT-System erhobenen Befunden, sowie zu den DDP-behandelten Zellen der vorliegenden Arbeit fanden sich verstärkte Heterochromatinauflagerungen bei den embryonalen Fibroblasten nach VDC- und TDC-Behandlung nur vereinzelt. Zellen, in denen die Gestalt des Kernes nicht von der der unbehandelten Zelle abwich, wiesen sogar deutlich weniger Heterochromatin an der Kernmembrannenseite auf, als unbehandelte Fibroblasten.

In vielen anderen Zellen kam es mit zunehmenden Zeitwerten zu einer Kernlappung, zu Kernmembraneinstülpungen bis hin zur Mehrkernigkeit. Diese mehrkernigen Riesenzellen waren besonders lichtmikroskopisch sehr auffällig und traten frühestens 48 h nach abgeschlossener Zytostatikabehandlung bei allen drei getesteten Substanzen auf. Sie waren gekennzeichnet durch verstärkt auftretende Heterochromatinauflagerungen an der Kernmembrannenseite. Ob es sich bei diesen Zellen um echte mehrkernige Zellen oder um Fibroblasten mit stark segmentierten Kernen handelte, ließ sich nicht eindeutig sagen. SODHI<sup>40</sup> bewies mittels einer Serienschnittanalyse an Sarcoma-180-Zellen nach DDP-Behandlung, daß es sich hier nicht um echte mehrkernige Zellen handelte, sondern die Kerne sehr stark segmentiert waren, wobei die einzelnen Segmente durch dünne Karyoplasmabrücken untereinander in Verbindung standen. Die Ähnlichkeit der Befunde der vorliegenden Studie mit den Ergebnissen von SODHI<sup>40</sup> ließ die Annahme zu, daß es sich hier um dasselbe Phänomen handelte.

Dem Auftreten dieser Zellen mußte größte Bedeutung beigemessen werden, da sie von verschiedenen Autoren nach DDP- und Metallocendichlorid-Behandlung beschrieben wurden (HEINEN & BASSLEER<sup>11</sup>, SODHI<sup>40</sup>, AGGARWAL<sup>38</sup>, KÖPF-MAIER<sup>24,25</sup>) und auch vielfach für die Deutung des Wirkungsmechanismus herangezogen wurden.

Als Ursache für die Entstehung dieser Zellen beschrieb KÖPF-MAIER<sup>24,25</sup> bereits verschiedene, mögliche Mechanismen. Am wahrscheinlichsten sah sie eine Blockade des Kernstoffwechsels in der prämitotischen G<sub>2</sub>-Phase an. Die Ausbildung von Kernoberflächenvergrößerungen, Kernmembraneinstülpungen und die Ausbildung von Doppelmembransystemen wären das morphologische Ebenbild dieses Blocks.

Obwohl Doppelmembransysteme bei den hier untersuchten Fibroblasten nicht entdeckt werden konnten, stimmten doch die anderen Befunde dieser Studie mit den Ergebnissen von KÖPF-MAIER<sup>24,25</sup> überein, so daß die postulierte G<sub>2</sub>-Blockierung durchaus auch auf die Fibroblasten zutreffen könnte.

Eine andere Möglichkeit der Entstehung von mehrkernigen Riesenzellen wäre eine Störung an den Mikrofilamenten oder Mikrotubuli. Es könnte unter diesen Bedingungen zu einer mehr oder weniger fortgeschrittenen Kernteilung kommen, ohne daß eine Zellteilung nachfolgen würde. Direkte Veränderungen an den Mikrofilamenten und Mikrotubuli waren bei den hier behandelten Fibroblasten nicht zu entdecken, wohl aber die von ACGARWAL<sup>1</sup> damit in engen Zusammenhang gebrachte kreisförmige Anordnung von Zellorganellen, insbesondere von Mitochondrien, um den Zellkern. Diese als Folge eines Defektes im Mikrotubulus- und Mikrofilamentsystems interpretierte Degeneration würde dann später zu einer inkompletten Durchtrennung des Zytoplasmas nach erfolgter Kernteilung führen, was wiederum mehrkernige Riesenzellen zur Folge haben könnte.

In vielen anderen Fibroblasten fand sich während des gesamten Beobachtungszeitraums ein extrem helles, elektronentransparentes Karyoplasma, teilweise waren auch Segregationerscheinungen der Nukleolusbestandteile zu erkennen. Es schien, als ob der Nukleolus seinen inneren Zusammenhang verlor. Dies konnte seine Ursache in der direkten Wirkung der getesteten Zytostatika auf die DNA haben. Durch die Ausbildung von "intrastrand-cross-links" könnte es zu Störungen innerhalb des regulären

DNA-Stoffwechsels gekommen sein. Auf diese Art und Weise wäre dann als Folge eine Störung im Koordinationszentrum der Kernteilung, dem Nukleolus, sichtbar geworden.

Das vielfältige Bild insbesondere 48 h und 72 h nach Behandlungsende deutete darauf hin, daß nicht nur ein Weg beschritten wurde, sondern daß die Metalloendochloride und das DDP eine Vielzahl von Zellveränderungen auslösten.

1. Die Kernveränderungen deuteten auf eine Blockierung des DNA-Stoffwechsels, vermutlich in der prämitotischen  $G_2$ -Phase hin. Möglicherweise waren die zytoplasmatischen Veränderungen eine Folge dieser Stoffwechselstörung. Insbesondere der Proteinstoffwechsel ist ja unmittelbar von der DNA abhängig.

2. Andererseits konnte im Rahmen dieser Studie nicht ausgeschlossen werden, daß der Proteinstoffwechsel unabhängig vom DNA-Stoffwechsel beeinflusst wird. Auch Angriffe an der RNA wären möglich.

3. Bei anderen Fibroblasten gab es Anzeichen für Störungen im Mikrofilament- und Mikrotubulussystem; damit wäre eine inkomplette Zellteilung nach erfolgter Kernteilung denkbar gewesen.

Die einzelnen Veränderungen konnten demnach nicht aufsummiert werden, sondern die Gesamtheit der Veränderungen ergab mosaikartig ein Spiegelbild der morphologischen Veränderungen nach erfolgter Behandlung mit DDP, TDC und VDC.

Zum Abschluß dieser Diskussion soll noch kurz auf das Phänomen der Virusinduktion unter Behandlung mit TDC und DDP eingegangen werden. Diesen Veränderungen und vor allem den nachfolgenden möglichen Konsequenzen wie der virusbedingten antigenen Oberflächenveränderung maßen KÖPF-MAIER<sup>24,26</sup> und SODHI<sup>41</sup> große Bedeutung zu.

Veränderungen dieser Art konnten im Rahmen dieser Arbeit an den embryonalen menschlichen Fibroblasten nicht beobachtet werden. Das ist an sich nicht überraschend, da es sich bei den hier untersuchten Zellen um normalstrukturierte Zellen handelte, und das Vorhandensein maskierter Viren, wie sie beim EAT und Sarcoma-180 angenommen werden, bei den Fibroblasten nicht wahrscheinlich war.

## 6. Zusammenfassung

Die Wirkung der Metallocen-dihalogenide TDC und VDC wurde im Rahmen dieser Arbeit zum erstenmal gegenüber nicht-malignen menschlichen Zellen untersucht; als Vergleichsssubstanz diente das klinisch erprobte DDP. Verwendet wurden hierzu embryonale humane Fibroblasten in einer Monolayerkultur. Sie wurden 90 min verschiedenen Konzentrationen der drei Zytostatika ausgesetzt; im Anschluß daran wurden die Zellen in frisches Nährmedium überführt. Der wachstumshemmende Effekt und die zelltoxische Wirkung wurden durch Erstellen von Wachstumsreihen bzw. durch Bestimmen der Avitalitätsindices ermittelt. Zur Untersuchung der morphologischen Veränderungen wurden außerdem licht- und elektronenmikroskopische Präparate in verschiedenen Zeitabständen nach der Zytostatikaexposition angefertigt.

Die Auswertung der Wachstumsreihen ergab zunächst, daß sowohl die Metallocen-dihalogenide TDC und VDC, als auch DDP einen wachstumshemmenden Effekt auf menschliche Fibroblasten ausüben. Dabei zeigte es sich, daß VDC bereits bei Konzentrationen von  $10^{-6}$  M bis  $10^{-5}$  M eine wachstumshemmende Wirkung hat, während TDC erst bei Konzentrationen von  $5 \times 10^{-4}$  M eindeutig zytostatische Eigenschaften hat. DDP hemmt das Zellwachstum der Fibroblasten bei einer Konzentration von etwa  $5 \times 10^{-6}$  M.

Der direkte zelltoxische Effekt aller drei Substanzen ist hoch. Bereits bei den niedrigsten getesteten Substanzkonzentrationen (DDP:  $5 \times 10^{-7}$  M, TDC:  $5 \times 10^{-5}$  M, VDC:  $10^{-6}$  M) waren zwischen 20% und 45% avitale Zellen nachzuweisen. Bei den höchsten getesteten Konzentrationen waren während des gesamten Beobachtungszeitraums annähernd 100% avitale Zellen zu finden.

Lichtmikroskopisch fiel zunächst das Fehlen von späten Mitoseformen, wie Meta-, Ana- und Telophasen, sowie von Mitoseanomalien auf. Andererseits waren 12 h nach Behandlungsende bei

allen drei Substanzen zahlreiche Prophasezellen nachzuweisen. Zu späteren Untersuchungszeitpunkten fielen Kernanomalien, wie Chromatinklumpungen oder Kerninvaginationen, sowie das Vorhandensein von ein- und mehrkernigen Riesenzellen auf.

Elektronenmikroskopisch zeigten sich nach Applikation der drei getesteten Substanzen bei den frühen Zeitwerten Verquellungen und Formänderungen der Mitochondrien sowie anschließend eine zahlenmäßige Zunahme dieser morphologisch veränderten Mitochondrien. Das rER und die GOLGI-Zisternen nahmen zwischen 6 h und 12 h nach Substanzapplikation augenscheinlich zu. Bei den Metalloccendihalogenen verringerte sich die Ausprägung des rER später jedoch wieder, 72 h nach Substanzgabe war kaum noch rER in den Fibroblasten nachzuweisen. Nach Gabe von DDP hingegen war das rER den ganzen Beobachtungszeitraum hindurch deutlich nachweisbar.

Im Kern zeigten sich nach Gabe von TDC und VDC im elektronenmikroskopischen Bereich nur dann Chromatinklumpungen, wenn auch die Kerngestalt verändert war. Ein großer Teil der Fibroblasten zeigte Kernmembraneinstülpungen, Kernsegmentierungen und später auch das Phänomen der Mehrkernigkeit; bei den in dieser Weise veränderten Zellen fanden sich auch Chromatinklumpungen im Karyoplasma. Andere Kerne blieben in ihrer Gestalt unverändert, wiesen ein helles Karyoplasma und kaum Chromatinklumpungen auf. Nach Behandlung mit DDP hingegen waren in fast allen Fibroblasten Chromatinklumpungen festzustellen. Der Nukleolus begann etwa 12 h nach Behandlung mit DDP, TDC und VDC bei zahlreichen Zellen zu segregieren und seine Bestandteile trennten sich voneinander. 48 h bis 72 h nach abgeschlossener Behandlung zeigten sich schließlich neben ein- und mehrkernigen Riesenzellen auch zahlreiche Nekroseformen.

Es scheint auch aufgrund dieser Studie wahrscheinlich, daß der Angriff der getesteten Zytostatika primär an der DNA des Kerns erfolgt. So dürfte es dadurch zur Blockierung des DNA-Stoff-

wechsels, wahrscheinlich in der  $G_2$ -Phase kommen, mit entsprechenden morphologischen Veränderungen der Zellen, wie sie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurden. Weitere Wirkungen der getesteten Zytostatika in Form von Beeinflussung des Proteinstoffwechsels (rER, GOLGI-Apparate) und des Mikrotubulus/Mikrofilamentsystems scheinen darüberhinaus vorzuliegen. Die Veränderungen der Mitochondrien waren nicht eindeutig zu interpretieren.

Literaturverzeichnis

- 1 AGGARWAL, S.K., SODHI A., Cytotoxic effects of cis-dichlorodiammineplatinum(II) on the mammalian cell in vitro. A fine structural study, Cytobiologie 7(1973) 366-374.
- 2 AGGARWAL, S.K., Inhibition of cytokinesis in mammalian cells by cis-dichlorodiammine-platinum(II), Cytobiologie 8(1974) 395-402.
- 3 AGGARWAL, S.K., OFOSU, G.A., WAKU, Y., Cytotoxic effects of Platinum-pyrimidine complexes on the mammalian cells in vitro: A fine structural study, Wad. Med. Bull. 6(1976).
- 4 AGGARWAL, S.K., Fine structural studies using platinum coordination complexes, J. clin. hematol. oncol. 7(1977) 760-796.
- 5 BARILE, M., Protocol for the staining procedure, using Bisbenzamide Flourochrome stain, Department of Health, Education and Welfare, Bethesda, Maryland.
- 6 BIERLING, R., Die Wirkung von Aktinomycinen auf menschliche Gewebe in vitro, Z. Krebsforsch. 63(1960) 519-522.
- 7 FAWCETT, D.W., Atlas zur Elektronenmikroskopie der Zelle, Urban und Schwarzenberg, München, Berlin, Wien, 1973.
- 8 GOTTLIEB, J.A., DREWINKO, B., Review of current clinical status of platinum coordination complexes in cancer chemotherapy, Cancer Chemother. Rep. 59(1975) 621-628.
- 9 GRUNDMANN, E., Allgemeine Cytologie, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1964.

- 10 HEINEN, E., BASSLEER, R., Mode of action of cis-dichlorodiammine-platinum(II) in mouse Ehrlich ascites tumor cells, *Biochem. Pharmacol.* 25(1976) 1871-1875.
- 11 HEINEN, E., BASSLEER, R., Cytological and cytochemical analysis of the effects of cis-dichloro-diamino platinum(II) in chick fibroblasts cultivated in vitro. *Chemother* 22(1976) 253-261.
- 12 HOLMBERG, B., on the permeability to lissamine green and other dyes in the cause of all injury and all death, *Exp. Cell Res.* 22(1961) 406-414.
- 13 KÖPF, H., KÖPF-MAIER, P., Titanocen-dichlorid - Das erste Metalloccen mit cancerostatischer Wirksamkeit, *Angew. Chemie.* 91(1979) 509.
- 14 KÖPF-MAIER, P., KÖPF, H., Vanadocen-dichlorid - ein weiteres Antitumor-Agens aus der Metalloccenreihe *Z. Naturforsch.* 34b(1979) 805-807.
- 15 KÖPF-MAIER, P., KÖPF, H., LEITNER M., VOIGTLÄNDER, R., Molybdocen-dichlorid als Antitumor-Agens, *Z. Naturforsch.* 34c(1979) 1174-1176.
- 16 KÖPF-MAIER, P., HESSE, B., KÖPF, H., Tumorsthemmung durch Metalloccene: Wirkung von Titanocen-, Zirconocen- und Hafnocen-dichlorid gegenüber Ehrlich-Ascites-Tumor der Maus, *J Cancer Res Clin Oncol* 96(1980) 43-51.
- 17 KÖPF-MAIER, P., KÖPF, H., Tumorsthemmung durch Titanocen-dichloride: First clues to the mechanism of action, *Naturwissenschaften* 67(1980) 415-416.

- 18 KÖPF-MAIER, P., HESSE, B., VOIGTLÄNDER, R., KÖPF, H., Tumor inhibition by metallocenes: Antitumor-activity of titanocene dihalides  $(C_5H_5)_2TiX_2$  ( $X = F, Cl, Br, I, NCS$ ) and their application in buffered solutions as a method for suppressing drug - induced side effects, *J Cancer Res-Clin Oncol* 97(1980) 31-39.
- 19 KÖPF-MAIER, P., LEITNER, M., KÖPF, H., Tumor inhibition by metallocenes: Antitumor activity of niobocene and tungstocene - dichlorides, *J Inorg Nucl Chem* 42(1980) 1789.
- 20 KÖPF-MAIER, P., KAHL, W., KLOURAS, N., HERMANN, G., KÖPF, H., Tumorerhemmung durch Metallocene: Ringsubstituierte und ringüberbrückte Titanocen-dichloride, *Eur. J. Med. Chem* 16(1981) 275-281.
- 21 KÖPF-MAIER, P., WAGNER, W., HESSE, B., KÖPF, H., Tumorerinhibition by metallocenes: activity against leukemias and detection of the systemic effect, *Europ J Cancer* 17(1981) 665-669.
- 22 KÖPF-MAIER, P., WAGNER, W., KÖPF, H., In vitro cell growth inhibition by metallocene dichlorides, *Cancer Chemother. Pharmacol* 5(1981) 237-241.
- 23 KÖPF, H., KÖPF-MAIER, P., Metallocendihalogenide als potentielle Zytostatika, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* 29(1981) 154-156.
- 24 KÖPF-MAIER, P., WAGNER, W., Morphologische Aspekte der Tumorerhemmung durch Metallocen-dihalogenide, 75. Verhandlungen der Anatomischen Gesellschaft. (1981), S.567-569.
- 25 KÖPF-MAIER, P., WAGNER, W., LISS, E., Cytokinetik behavior of Ehrlich ascites tumor after in vivo treatment with cis-diammindichloroplatinum(II) and metallocene-dichlorides, *J Cancer Res Clin Oncol* 102(1981) 21-30.

- 26 KÖPF-MAIER, P., Development of necroses, virusactivation and giant cell formation after treatment of Ehrlich ascites tumor with metallocene dichlorides, J Cancer Res Clin Oncol 103(1982).
- 27 KÖPF-MAIER, P., KRAHL, D., In vitro treatment with metallocene dichlorides: Determination of the intracellular distribution of the metal atoms by use of the electron energy loss spectroscopy. In: Neubert D, Merker, H.J., (Herausgeber) Applicability of culture techniques for studies on prenatal differentiation and toxicity. de Gruyter, Berlin (1982).
- 28 LENTZ, T.L., Cell Fine Structure, W.B. Saunders Company (1971).
- 29 LUFT, J.H., Anat. Rec. 171(1971) 369.
- 30 NEUMANN, W., BECHMANN, G., Der Einsatz von Lab-Tek-Zellkultur Objektträgern in der virologischen Laboratoriumsdiagnostik Dtsch tierärztl. Wschr. 87(1980) 408-409.
- 31 PEYRONE, M., Über die Einwirkung des Ammoniaks auf Platinchlorüre, Justus Liebigs Ann. Chem. 51(1844) 1-29.
- 32 ROSENBERG, B., VAN CAMP, L., KRIGAS, T., Inhibition of cell division in Escherichia Coli by electrolysis products from a platinum electrode, Nature 205(1965) 698.
- 33 ROSENBERG, B., VAN CAMP, L., TROSKO, J.E., Platincompounds: A new class of potent antitumor agents, Nature (Lond) 222(1969) 385-386.
- 34 ROSENBERG, B., VAN CAMP, L., The successful regression of large solid sarcoma-180 tumors by platinum compounds, Cancer Research 30(1970) 1799-1802.

- 35 REYNOLDS, E.S., The use of lead citrate at high pH as an elektron-opaque stain in electron-microscopy, J. Cell Biol. 17(1963) 208-212.
- 36 ROSS, P.W., Cell volume growth after cellcycle block with chemotherapeutic agents, Cell Tissue Kinet. 9(1976) 379-387.
- 37 SCHARLACH, E., ZIMMERMANN, B., Cell-substrate adhesin of fibroblast-like cells under different in vitro conditions. A scanning and transmission electron-microscopy study, Culure Techniques. Fifth Symposium Prenatal Development (1981) 477.
- 38 SODHI, A., AGGARWAL, S.K., Effects of cis-dichlorodiammine-platinum(II) in the regression of sarcoma-180: A fine structural study, J Natl. Cancer Inst. 53(1974) 85-101.
- 39 SODHI, A., Ultrastructural changes of sarcoma-180 cells after treatment with cis-dichlorodiammineplatinum(II), in vivo & in vitro, Indian Journal of Experimental Biology 14(1976) 383-390.
- 40 SODHI, A., Origin of giant cells in regressing sarcoma-180 after cis-dichlorodiammine Platinum(II)-treatment: A fine structural study. J. Clin. Hematol. Oncol 7(1977) 569-579.
- 41 SODHI, A., SARNA, S., Ultrastructural observations on the effect of cis-dichlorodiammine Platinum(II) on the cells of fibrosarcoma in swiss white mice, Indian Journal of Experimental Biology 17(1979) 1-8.
- 42 STOCKINGER, L., Das Kernkörperchen, Protoplasma (Wien) 42(1953) 365-413.

- 43 STOCKINGER, L., KELLNER, G., Der Lymphozytenukleolus. I. Mittl Die Darstellung und Bedeutung des Nukleolus, Wien. Z. inn. Med. 33(1952) 135-141.
- 44 WILKINSON, G., BIRMINGHAM, J.M., Bis-cyclopentadienyl compounds of Ti, Zr, V, Nb and Ta. J. Am. Chem. Soc. 76(1954) 4281-4284.
- 45 WITSHAW, E., KRONER, T., Phase II study of cis-dichloro-diamminplatinum(II) (NSC - 119857) an advanced adenocarcinoma of the ovary. Cancer Treat. Rep. 60(1976) 55-60.





## Danksagung

Frau Privat-Doz. Dr. Petra Köpf-Maier gilt mein allerherzlichster Dank für die Überlassung des Themas und die vorzügliche Betreuung und Unterstützung während der Durchführung meiner Dissertation.

Frau Dietlinde Greiff danke ich für die experimentelle Unterstützung bei der Anfertigung des elektronenmikroskopischen Teils meiner Arbeit.

Frau Gisela Lange danke ich für die hervorragende fotografische Betreuung.

Meinem Bruder Jörg gilt mein besonderer Dank für die tatkräftige und zeitaufwendige Unterstützung bei der Durchführung der Schreibarbeiten.



## Lebenslauf

Gordian Hermann

geb. am 16.12.1956

in Herrsching/ a. Ammersee

Vater: Dr. Hans Hermann, Studiendirektor

Mutter: Charlotte Hermann, geb. Behnke

1963 - 1966 Besuch der Grundschule in Polling

1966 - 1967 Besuch der evangelischen Grundschule  
in Weilheim

1967 - 1976 Besuch des mathematisch-naturwissenschaft-  
lichen Gymnasiums in Weilheim

1976 Abiturprüfung

1976 - 1978 Ableistung des freiwilligen Wehrdienstes  
bei der Gebirgstruppe in Mittenwald,  
letzter Dienstgrad: Oberfähnrich d. Res.

1978 - 1983 Studium der Zahnmedizin an der Freien  
Universität Berlin

1979 Naturwissenschaftliche Vorprüfung,  
bestanden mit "sehr gut"

1979 - 1980 Tätigkeit als studentische Hilfskraft im  
Arbeitskreis "Metallocene" bei Herrn  
Prof. Dr. Köpf an der TU Berlin

1980 Zahnärztliche Vorprüfung,  
bestanden mit "sehr gut"

August 1983 Staatsexamen, bestanden mit "sehr gut"

25. August 1983 Approbation als Zahnarzt





